FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

ANNÉE 1947 N° 21

THÈSES

présentées
à la Faculté de Pharmacie de l'Université de Paris
pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE D'ÉTAT

par

René TRUHAUT

Pharmacien-Chef des Hôpitaux Psychiatriques de la Seine
Chef du Service de Chimie à l'Institut du Cancer de l'Université de Paris
Lauréat de la Faculté de Pharmacie de Paris

1re THÈSE

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES FACTEURS CHIMIQUES DE CANCÉRISATION. — LE PROBLÈME DES SUBSTANCES CANCÉRIGÈNES ENDOGÈNES

2me THÈSE

PROPOSITION DONNÉE PAR LA FACULTÉ :
LES DÉRIVÉS ORGANIQUES HALOGÉNÉS DOUÉS DE PROPRIÉTÉS INSECTICIDES.

Soutenues le 10 Juillet 1947, devant la Commission d'examen.

Président : R. FABRE

Examinateurs : P. FLEURY, J. COURTOIS

SOCIETE D'EDITION D'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
Siège social : 99, boulevard Saint-Michel
PARIS (Ve)

FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

ANNÉE 1947 N°.....

THÈSES

présentées
à la Faculté de Pharmacie de l'Université de Paris
pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE D'ÉTAT

par

René TRUHAUT

Pharmacien-Chef des Hôpitaux Psychiatriques de la Seine
Chef du Service de Chimie à l'Institut du Cancer de l'Université de Paris
Lauréat de la Faculté de Pharmacie de Paris

1re THÈSE

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES FACTEURS CHIMIQUES DE CANCÉRISATION. — LE PROBLÈME DES SUBSTANCES CANCÉRIGÈNES ENDOGÈNES

2me THÈSE

PROPOSITION DONNÉE PAR LA FACULTÉ : LES DÉRIVÉS ORGANIQUES HALOGÉNÉS DOUÉS DE PROPRIÉTÉS INSECTICIDES.

Soutenues le 10 Juillet 1947, devant la Commission d'examen.

Président : R. FABRE

Examinateurs : P. FLEURY, J. COURTOIS

SOCIETE D'EDITION D'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
Siège social : 99, boulevard Saint-Michel
PARIS (Ve)

Personnel de la Faculté de Pharmacie de Paris

ADMINISTRATION :

MM. RENÉ FABRE, *Doyen*, ✻, ✪ I.
HENRI SOMMELET, *Assesseur*, ✻, ✪ I.
H.-J. LIONNET, *Secrétaire*, ✻, ✪ I.

PROFESSEURS :

MM. SOMMELET, ✻, ✪ I.	Chimie organique.
FABRE, O. ✻, ✪ I.	Toxicologie.
PICON, ✻, ✪ I.	Chimie minérale.
DELABY, ✻, ✪ I.	Pharmacie chimique.
MASCRÉ, ✻, ✪ I.	Botanique.
SARTORY, C. ✻, ✪ I.	Microbiologie.
FLEURY, ✻, ✪ I.	Chimie biologique.
JANOT, ✪ I.	Pharmacie galénique.
VALETTE, ✪ I.	Zoologie appliquée.
CHARONNAT, ✪ I.	Chimie analytique.
BEDEL, ✻, ✪ I.	Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie.
PARIS	Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale.
GUILLOT	Physique.
RAOUL	Professeur sans chaire.

Doyens honoraires : MM. RADAIS, O. ✻, ✪ I. — GUÉRIN, O. ✻, ✪ I.

Professeurs honoraires :

MM. :
DELÉPINE, O. ✻, ✪ I. et LÉBEAU, O. ✻, ✪ I., Membres de l'Institut.
PERROT, C. ✻, ✪ I., COUTIÈRE, O. ✻, ✪ I., BOUGAULT, O. ✻, ✪ I.
LUTZ, ✻, ✪ I., GORIS, O. ✻, ✪ I., HÉRISSEY, O. ✻, ✪ I.
LAUNOY, O. ✻, ✪ I.

MAITRES DE CONFÉRENCES :

MM. GAUTIER, ✪ I.	Sciences physiques et chimiques.
N.	Sciences naturelles.
DOMANGE, ✪ I.	Sciences physiques et chimiques.
CRÉTÉ	Sciences naturelles.
COURTOIS	Sciences physiques et chimiques.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES :

MM. CORRIEZ, ✪ I.	Physique.
N.	Chimie biologique, Bromatologie et Pharmacie chimique.
MORETTE, travaux pratiques de 2e et 3e années.	Chimie analytique.
Mlle LAMBIN, ✪ I.	Microbiologie.
MM. HARISPE, travaux pratiques de 1re année	Chimie générale et pharmaceutique.
N.	Micrographie.

Bibliothécaire en Chef : M. GARNIER, ✪ A.
Bibliothécaire : Mlle LAVAUD, ✪ A.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

A MONSIEUR LE PROFESSEUR R. FABRE

Doyen de la Faculté de Pharmacie de Paris
Professeur de Toxicologie à la Faculté de Pharmacie de Paris
et à l'Institut d'Hygiène Industrielle et de Médecine du Travail
de la Faculté de Médecine de Paris
Membre de l'Académie de Médecine
Pharmacien-Chef des Hôpitaux de Paris
Officier de la Légion d'Honneur

Au Maître éminent, qui m'a fait le très grand honneur d'accepter d'être le Président de mon Jury de thèse et qui m'a fait bénéficier, si souvent et d'une manière affable de sa grande expérience de la recherche scientifique et de son exceptionnelle largeur de vue.

Hommage de respectueuse reconnaissance et d'affectueux et absolu dévouement.

A MON MAITRE

MONSIEUR LE PROFESSEUR C. SANNIE

Professeur de Chimie au Muséum d'Histoire Naturelle
Professeur Honoraire à la Faculté de Médecine de Paris
Directeur de l'Identité Judiciaire
Ex-Chef du Service de Chimie
à l'Institut du Cancer de l'Université de Paris
Officier de la Légion d'Honneur

Qui m'a dirigé au cours de ce travail, dont ses conseils éclairés jalonnèrent chaque étape.

Il est pour moi plus qu'un Maître. Qu'il me soit permis de lui redire ma respectueuse affection.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR P. FLEURY

Professeur de Chimie Biologique à la Faculté de Pharmacie de Paris
Pharmacien-Chef des Hôpitaux Psychiatriques de la Seine
Chevalier de la Légion d'Honneur

Qui m'a fait le très grand honneur de faire partie de mon Jury de thèse.

En témoignage de respectueuse gratitude et d'affectueux attachement.

A MONSIEUR J. COURTOIS

Maître de Conférences
A la Faculté de Pharmacie de Paris
Pharmacien-Chef des Hôpitaux de Paris

En témoignage d'affectueuse reconnaissance, pour m'avoir réservé sa première participation à un Jury de thèse.

A MES PARENTS

A TOUS LES MIENS

A MES AMIS

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES FACTEURS CHIMIQUES DE CANCÉRISATION

LE PROBLÈME DES SUBSTANCES CANCÉRIGÈNES ENDOGÈNES

INTRODUCTION

Le travail que nous présentons a trait à l'un des plus importants mais aussi des plus complexes parmi les problèmes biologiques : le problème du cancer ; problème sur lequel, dans le monde entier, se penchent des chercheurs de toutes les disciplines.

Depuis 1930, *c'est le point de vue biochimique qui a retenu notre attention. Mais, dans ce domaine, il est impossible et il serait néfaste de rester cantonné dans sa discipline propre et c'est pourquoi, dans ce travail, doivent nécessairement trouver place des concepts et des faits débordant très largement le cadre de la Chimie biologique.*

Il faut avoir pratiqué la cancérologie pour savoir combien des résultats d'abord enthousiasmants et pleins de perspectives deviennent vite décevants et contradictoires. Ce n'est pas un domaine où l'on peut aller vite. Il s'agit de recherches de longue haleine qui ne peuvent que très rarement être considérées comme achevées et la sauvegarde des priorités, même du strict point de vue « prestige français », nécessite la publication des résultats acquis, même s'ils sont fragmentaires. Cette remarque explique que certaines parties de ce travail aient été déjà publiées. Je fais surtout allusion ici à la question des substances cancérigènes endogènes, sujet en pleine évolution, auquel, avec notre Maître, le Professeur Sannié, *nous avons été parmi les tout premiers à nous intéresser et qui fait, à l'heure actuelle, l'objet de recherches dans les laboratoires de tous les pays.*

Le point de départ de nos recherches a été la découverte, vers 1930, *par l'Ecole anglaise de* Cook et Kennaway, *du « Research Institute of the Cancer hospital » de Londres, de substances chimiques définies douées d'activité cancérigène. Comme ces substances possédaient une nette parenté de constitution chimique avec des composés normaux de l'organisme d'une très grande importance biologique : les Stérols et leurs dérivés (Acides biliaires, Hormones sexuelles, Hormones cortico-surrénales...),* Cook *et* Kennaway *émirent l'hypothèse que le cancer pourrait bien avoir sa cause dans la formation, au sein de l'organisme même, de substances cancérigènes. C'était une hypothèse de plus parmi celles émises au sujet de la génèse du cancer, mais il s'agissait d'une hypothèse biochimique et, comme telle, elle nous apparut particulièrement séduisante. C'est,*

guidés par elle, que nous avons effectué la grande majorité des expériences décrites au cours de ce travail qui constitue une première étape de nos recherches.

Nous diviserons notre exposé en quatre parties :

Dans une première partie, nous rappellerons les notions essentielles sur les divers agents chimiques cancérigènes actuellement connus, avec une contribution personnelle à la discussion de leur mécanisme d'action.

Dans une deuxième partie, nous exposerons les résultats personnels obtenus dans l'étude expérimentale de l'un de ces agents chimiques : le 3.4. *benzopyrène, synthétisé et purifié par nous.*

Dans une troisième partie, nous décrirons nos recherches relatives à l'action cancérigène éventuelle, dans certaines conditions, de substances biologiques pouvant intervenir, soit par leur présence, soit par leur absence dans l'alimentation : Huile de germe de Blé, Ion Magnésium, Hormones de croissance végétale.

Dans une quatrième partie enfin, nous apporterons nos résultats relatifs à la possibilité d'une synthèse in vivo *de produits cancérigènes à partir de molécules physiologiques. Après un exposé sur les diverses directions dans lesquelles peuvent être poussées de telles recherches, exposé qui constituera le premier chapitre de cette quatrième partie, nous décrirons les recherches que nous avons faites avec le cholestérol irradié par les rayons X. Enfin, nous aborderons les essais d'isolement de substances cancérigènes à partir de l'organisme cancéreux. C'est là la partie la plus importante de notre travail. Elle comporte la préparation de fractions ; leur essai sur l'animal et l'étude de leurs effets sur les cellules en culture, leur examen spectrographique et leur fractionnement par les méthodes physico-chimiques (chromatographie) ou purement chimiques. Tous ces points, auxquels nous adjoindrons l'examen critique des résultats obtenus sur le même sujet par divers chercheurs, feront l'objet des derniers chapitres de notre travail.*

***

Nous avons l'honneur et la chance d'avoir comme Président de notre Jury de thèse, notre Maître : le Professeur R. Fabre, *Doyen de la Faculté de Pharmacie de Paris, Professeur de Toxicologie à la Faculté de Pharmacie de Paris et à l'Institut d'Hygiène Industrielle et de Médecine du Travail de la Faculté de Médecine de Paris, Membre de l'Académie de Médecine, Pharmacien-Chef des Hôpitaux de Paris. Nous avons été successivement son Interne et son Elève. Infiniment précieux ont été, pour nous, sa haute compétence technique. son solide bon sens, ses encourage-*

ments et son amicale compréhension des jeunes. Nous sommes heureux de lui redire ici toute notre respectueuse gratitude et notre absolu dévouement.

Au Professeur P. Fleury, *Professeur de Chimie biologique à la Faculté de Pharmacie de Paris, Pharmacien-chef des Hôpitaux Psychiatriques de la Seine, qui nous a fait l'honneur d'accepter de faire aussi partie de notre Jury de thèse et qui, avec une sollicitude jamais démentie, nous a si souvent fait bénéficier de sa grande érudition et de sa précieuse expérience biochimique, nous avons grand plaisir à dire toute notre respectueuse et reconnaissante admiration et aussi l'honneur d'être son collègue aux Hôpitaux Psychiatriques de la Seine.*

C'est enfin une grande joie pour nous que la première thèse qu'ait à faire passer notre ami J. Courtois, *Pharmacien-Chef des Hôpitaux de Paris, récemment promu Maître de Conférences à la Faculté de Pharmacie de Paris, soit justement la nôtre. Nous sommes émus en pensant qu'un de nos Juges est un vieux camarade de toujours et nous en profitons pour lui réaffirmer ici la profondeur de notre affectueuse amitié.*

*
**

Une grande partie de ce travail a été réalisée sous la Direction de C. Sannié, *Professeur de Chimie des corps organisés au Muséum d'Histoire naturelle et Directeur des services scientifiques de l'Identité judiciaire à la Préfecture de Police de Paris. Il a guidé nos premiers pas dans la recherche scientifique et beaucoup des résultats présentés dans ce travail ont été obtenus en collaboration étroite avec lui. C'est pour nous un très agréable devoir de lui dire ici, en même temps que notre affectueuse déférence, toute notre reconnaissance pour les conseils éclairés qu'il nous a prodigués et l'exemple qu'il nous a fourni.*

Si nous avons pu nous consacrer à la recherche dans le domaine du Cancer, c'est grâce au Recteur G. Roussy, *fondateur de l'Institut du Cancer de Paris. C'est lui qui nous a fait le grand honneur de nous confier, à partir de* 1930, *les fonctions de Chef de Laboratoire puis, à partir de* 1941, *celles de Chef du service de Chimie. Nous le remercions du fond du cœur et très respectueusement de la confiance qu'il nous a témoignée et aussi de la diffusion que sa haute autorité a pu donner à nos recherches dans les milieux scientifiques internationaux.*

Nous tenons à assurer également M. R. Huguenin, *Professeur Agrégé à la Faculté de Médecine de Paris, Directeur du Centre anticancéreux de l'Institut du Cancer, avec lequel nous poursuivons depuis de nombreuses années des recherches sur les modifications humorales et tissulaires au cours des états cancéreux, de notre entier dévouement et de notre affectueuse gratitude pour la bienveillance avec laquelle il a mis à notre dis-*

position sa précieuse expérience clinique et ses vastes et profondes connaissances dans le domaine du cancer.

Il nous reste à remercier les docteurs E. Vermes *et* M. Guérin, *nos collègues à l'Institut du Cancer, auxquels nous sommes redevables de toute la partie histologique et anatomo-pathologique de notre travail, à laquelle ils ont apporté toute leur compétence de spécialistes avertis et leur inlassable dévouement d'amis sûrs.*

Enfin, nous ne saurions terminer cette introduction sans adresser à la mémoire de notre ami, le docteur Paul Guérin (1899-1942), *arraché à la vie avant d'avoir pu donner sa mesure et qui participa à notre première série d'essais sur l'animal avec l'insaponifiable de foies, l'hommage profondément attristé de notre affectueuse reconnaissance.*

PREMIERE PARTIE

LES SUBSTANCES CHIMIQUES, AGENTS DE CANCÉRISATION EXPÉRIMENTALE

Nous avons antérieurement, à plusieurs reprises, publié des revues générales sur ce sujet, soit seul (382), soit en collaboration avec C. Sannié (330). La question étant en pleine évolution, et des faits nouveaux ayant été acquis en abondance au cours de ces dernières années, nous allons essayer de résumer, le plus brièvement qu'il nous sera possible, l'état actuel de nos connaissances dans ce domaine.

Nous rappellerons tout d'abord que c'est la constatation clinique de l'existence de cancers professionnels chez des ouvriers travaillant dans certaines industries chimiques qui a mis sur la voie de la découverte des substances cancérigènes ; on a décrit ainsi le cancer des industries arsenicales, le cancer des ramoneurs, le cancer des teinturiers d'aniline, le cancer des paraffineurs et des raffineurs du pétrole, celui enfin des ouvriers travaillant les sous-produits de la houille et en particulier les goudrons. Nous n'insisterons pas sur les recherches effectuées sur ces cancers professionnels, puisque nous les avons longuement exposées par ailleurs (330).

L'observation de ces cancers conduisit à essayer de provoquer expérimentalement du cancer chez l'animal en utilisant des substances chimiques et c'est ainsi qu'en 1915, deux biologistes japonais, Yamagiwa et Itchikawa (419), réussirent, par des badigeonnages répétés avec du goudron, de la peau du Lapin, choisi comme animal d'expérience, à obtenir des cancers cutanés. Leurs résultats furent confirmés et étendus à d'autres espèces animales, en particulier par Tsutui (386) et par Fibiger et Bang (120). L'application répétée de goudron sur la peau des animaux devint ainsi très rapidement une méthode pratique et sûre de cancérisation expérimentale, utilisée par tous les laboratoires s'occupant de cancérologie.

Mais les goudrons sont, comme on le sait, des substances extrêmement complexes et il restait à en isoler et à en identifier la ou les substances responsables de l'activité cancérigène. Des recherches très nombreuses furent effectuées que nous avons relatées dans nos revues générales antérieures. Finalement, grâce surtout aux efforts de l'Ecole anglaise avec

Cook, Kennaway, Mayneord et Hieger, elles aboutirent à l'isolement ou à la synthèse de carbures polycycliques cancérigènes et en particulier du 3.4. benzopyrène en 1933. La voie était tracée et les chimistes organiciens du monde entier s'évertuèrent dès lors à synthétiser de nouvelles molécules cancérigènes dont le nombre dépasse actuellement très largement la centaine.

On peut très simplement classer les substances cancérigènes en dérivés minéraux et en dérivés organiques.

I) — Dérivés minéraux

Nous ne parlerons pas des substances radio-actives (Radium, Thorium, Mésothorium, Ionium et tout récemment Plutonium) dont l'action cancérigène se rattache à une émission d'énergie radiante et dont l'étude a donné lieu à des mises au point tout à fait complètes par Lacassagne (214).

Dans ces conditions, deux catégories de dérivés minéraux peuvent manifester, dans certains cas, une activité cancérigène.

A) *LES DERIVES ARSENICAUX.* — Comme le souligne Lacassagne (215), « l'arsenic a été la première substance chimique pure, identifiée comme possédant le curieux pouvoir de faire apparaître la dégénérescence maligne de certaines cellules de l'organisme ». Lacassagne rappelle, de ce point de vue, les observations sur l'Homme de Paris (280), Pozzi (292), Hutchinson (177), Franseen et Taylor (131), Letch et Kennaway (234), Carrel (64), White (407), Haagen (154), Simoes Raposo (357), Hueper (172), Petroff et Krotkina (287), et surtout Schinz et Uehlinger (341), sur l'animal et, enfin, de Bucher (54) sur les cultures de tissus.

Tous ces travaux ont montré que les dérivés minéraux de l'arsenic, et spécialement l'anhydride arsénieux et les arsénites, à dose d'intoxication chronique, pouvaient cancériser l'épiderme. Il est intéressant de noter qu'aucun cas probant de cancérisation n'a pu être imputé à des traitements répétés par des arsenicaux organiques.

B) *LES SELS DE ZINC.* — C'est en 1925 que, le premier, Michalovsky (260) obtint le développement d'un tératome, en injectant 0 cc 3 d'une solution aqueuse à 5 % de chlorure de Zinc dans le testicule d'un Coq. Depuis lors, cet auteur et ses élèves ont pu, à treize reprises différentes et en se plaçant dans les mêmes conditions techniques, déterminer la formation, chez le Poulet, de cancers semblables et d'identiques localisations. Des expériences de contrôle entreprises en 1934 par Livrage (242) et en 1936 par Bagg (15), ont abouti à des constatations analogues, 10 % seulement des animaux utilisés se montrant sensibles à l'action du chlorure de Zinc injecté. Les caractères histologiques et les modalités

évolutives ne permettaient pas de douter que les tumeurs expérimentales de MICHALOVSKY fussent malignes. ANISSIMOVA (4) en a fourni (1939) une nouvelle preuve en montrant qu'elles pouvaient être inoculées et se développer chez des animaux neufs.

Le chlorure n'est pas le seul sel de Zinc susceptible de provoquer des tumeurs. Le sulfate peut lui être substitué. FALIN et GROMZEWA (119) ont obtenu (1939) des tératomes de structure tout à fait semblable à celle des tumeurs décrites par MICHALOVSKY en pratiquant, chez des Coqs, des injections intratesticulaires — 0 cc 15 à 0 cc 2 — d'une solution de sulfate de Zinc à 10 %. L'intérêt de cette variante était de rechercher si, dans la production de tels cancers, le métal était l'élément actif ou s'il fallait incriminer l'un ou l'autre des ions (Cl^-) ou (SO_4^{--}) sur lequel il était fixé. Il semble bien que le métal soit réellement l'agent causal.

Pour en terminer avec l'action cancérigène de certains dérivés minéraux, il nous faut signaler que UEHLINGER et SCHINZ (389), expérimentant sur le Lapin, ont pu obtenir des cancers chez cet animal, par introduction de métaux ou de métalloïdes purs tels que le Chrome, le Cobalt ou l'Arsenic à la dose de 0 g. 10 à 0 g. 15.

II) — Dérivés organiques

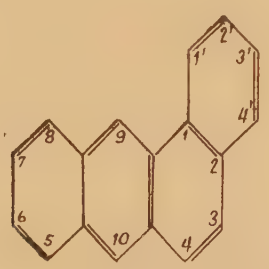
Ce sont de très loin les plus nombreux et aussi les plus intéressants. Nous conserverons pour leur étude la classification, que nous avons été le premier à proposer, en deux groupes principaux :

Le Groupe des composés cancérigènes non azotés;

Le Groupe des composés cancérigènes azotés.

LES COMPOSÉS CANCÉRIGÈNES NON AZOTÉS

Nous les diviserons en deux groupes, suivant qu'ils dérivent ou non du 1.2. benzanthracène. Le 1.2. benzanthracène :



1.2. BENZANTHRACÈNE

est un carbure tétracyclique. Il n'a lui-même qu'un pouvoir cancérigène nul ou à peu près nul. Il est cependant très important, non seulement parce que son squelette se retrouve dans des composés cancérigènes très actifs, mais aussi parce qu'il possède une propriété physique qui a joué un rôle considérable dans la découverte des premiers carbures cancérigènes. C'est en effet parce qu'on a retrouvé dans les goudrons et les huiles minérales cancérigènes un spectre de fluorescence à trois bandes caractéristiques (4.000, 4.180 et 4.400 Å), remarquablement voisin de celui du 1.2. benzanthracène, que les recherches se sont orientées vers les hydrocarbures à squelette benzanthracénique.

COMPOSÉS CANCÉRIGÈNES SE RATTACHANT AU 1.2. BENZANTHRACÈNE

Les carbures cancérigènes se rattachant au 1.2. benzanthracène dérivent de ce carbure, soit par accolement d'un nouveau cycle hexagonal ou pentagonal : on a alors des carbures pentacycliques ; soit par introduction dans la molécule de radicaux substituants gras : on a alors des carbures tétracycliques.

Parmi les carbures pentacycliques, dérivés du 1.2. benzanthracène, se rencontrent des agents très actifs :

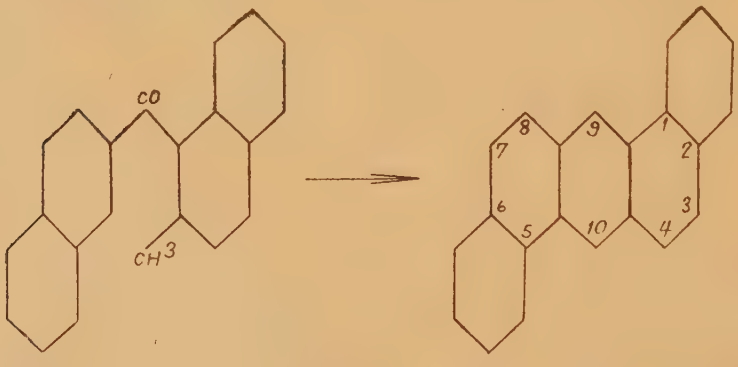
1.2.5.6. Dibenzanthracène.

3.4. Benzopyrène.

Cholanthrène et Méthylcholanthrène.

*
**

Le 1.2.5.6. dibenzanthracène a été décrit en 1929 par Clar (71) qui l'a obtenu dans la pyrolyse de la 2. méthyl 1.2' dinaphtylcétone.

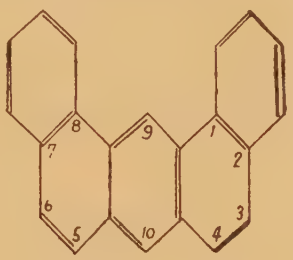


2. Méthyl - 1.2' Dinaphtylcétone — 1.2.5.6. Dibenzanthracène

Comme on le voit, il résulte de l'accolement à la molécule du 1.2. benzanthracène d'un nouveau cycle hexagonal en 5.6. Clar avait cru

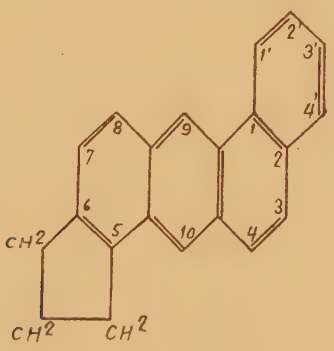
avoir affaire au 1.2.7.8. dibenzanthracène. Cook (75) établit en 1931 que l'hydrocarbure ainsi préparé ne possédait pas la structure 1.2.7.8., mais bien la structure 1. 2. 5. 6. Les propriétés cancérigènes de ce carbure furent établies d'abord par Kennaway et Hieger (194) puis par Cook, Hieger, Kennaway et Mayneord (76).

On a étudié l'influence de la place de l'accolement d'un nouveau cycle et on a vu qu'elle était très importante. C'est ainsi que 1.2.7.8. dibenzanthracène est extrêmement peu cancérigène.



1.2.7.8. Dibenzanthracène

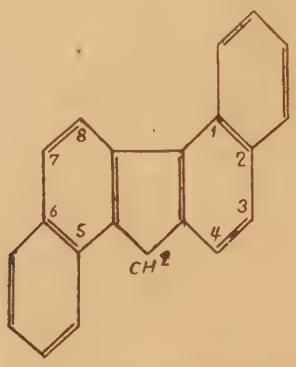
L'influence de la position d'accolement se retrouve si l'on accole au 1.2. benzanthracène, non plus un cycle hexagonal, mais un cycle pentagonal ; c'est ainsi que le 5.6. cyclopenténo-1.2. benzanthracène est beaucoup plus cancérigène que le 6.7. cyclopenténo-1.2. benzanthracène



5.6. Cyclopenténo - 1.2. Benzanthracène

On a étudié ensuite l'influence de très légères modifications de structure ou de formule. On a vu, par exemple, que le 1.2.5.6. dibenzofluorène, qui résulte du remplacement du cycle hexagonal central du 1. 2. 5. 6. dibenzanthracène par un cycle pentagonal, conserve une certaine activité cancérigène. Il en est de même d'ailleurs, ainsi que l'ont montré Badger,

Cook, Hewett, Kennaway, Kennaway et Martin (13), du 1.2.3.4. et du 1.2.7.8. dibenzofluorène, alors que le 3.4.5.6. dibenzofluorène est inactif.

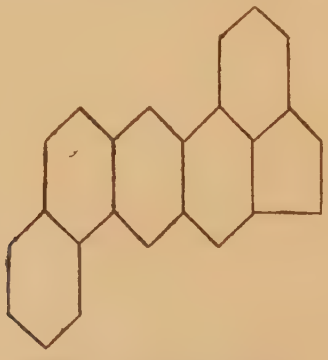


1.2.5.6. Dibenzofluorène

On a étudié également l'influence du remplacement de l'"un ou des deux carbones 9 et 10 (carbones Méso) par un ou deux atomes d'azote : alors que les dibenzacridines, qui ne renferment qu'un atome d'azote, sont cancérigènes, les dibenzophénazines, qui en renferment deux, sont dépourvues d'action. Nous en reparlerons à propos des substances cancérigènes azotées.

Les tentatives pour accroître l'activité du 1.2.5.6. dibenzanthracène, par une substitution effectuée sur une position favorable de la molécule, ont échoué. C'est ainsi que le 3' méthyl 1.2.5.6. dibenzanthracène est moins cancérigène que le carbure initial.

On a étudié aussi l'influence de l'augmentation de complexité moléculaire. Cook a préparé des dérivés du 1.2.5.6. dibenzanthracène résultant de l'accolement de un, deux ou trois cycles. Sauf le phénanthracènaphtène, tous les dérivés essayés se sont montrés dépourvus d'action.



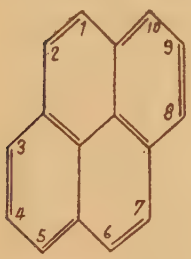
Phénanthracènaphtène

*
**

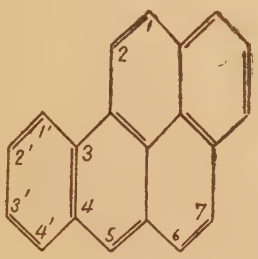
Le 3.4, benzopyrène est le seul carbure cancérigène qui ait été isolé du goudron de houille. Cet isolement a été réalisé par Cook, Hewett et Hieger (77) en 1933, à partir des fractions du brai passant à la distillation entre 500 et 510° qu'ils ont soumises à des extractions par divers solvants, pour finalement précipiter le carbure à l'état de picrate ; la même année, ils en ont réalisé la synthèse que nous aurons l'occasion d'étudier plus loin.

Le 3.4. benzopyrène est un carbure cancérigène très actif dont l'action est près de deux fois supérieure à celle du 1.2.5.6. dibenzanthracène. C'est le composé qui a été jusqu'ici le plus employé, avec le méthylcholanthrène, dans les expériences de cancérisation expérimentale. C'est avec lui que nous avons effectué nos recherches personnelles.

Si l'on examine sa formule,



Pyrène



3.4. Benzopyrène

on voit qu'on peut le considérer à la fois comme dérivant du pyrène par accolement d'un nouveau cycle en 3.4., ou comme dérivant du 1.2. benzanthracène par accolement en 1'9 d'un nouveau cycle pentagonal. L'accolement en 1'9 apparaît donc ici supérieur à l'accolement à 5.6. du point de vue de l'activité cancérigène. Il est vrai que Barry, Cook, Haslewood, Hewett, Hieger et Kennaway (16) considèrent que, si le 3.4. benzopyrène constitue une exception à la règle des positions 5.6. favorables à la cancérisation, il faut tenir compte de ce qu'il n'est pas du même type que les autres dérivés, à cause de son système de cycles aromatiques beaucoup plus condensé.

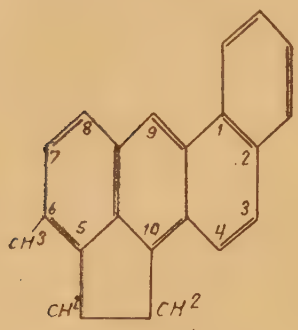
Notons pour terminer que le 1.2. benzopyrène, isolé du brai, à côté du 3.4. benzopyrène, par Cook, Hewett et Hieger et synthétisé par eux, n'a pas d'action cancérigène.

*
**

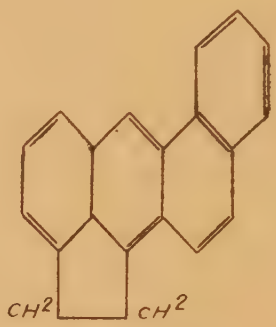
Le méthylcholanthrène et le cholanthrène sont encore plus actifs que le 3.4. benzopyrène.

L'intérêt de leur étude vient de leurs rapports étroits avec un groupe de constituants importants de l'organisme animal : les acides biliaires. C'est ainsi que le méthylcholanthrène peut être synthétisé à partir de l'un ou l'autre des deux principaux acides existant dans la bile humaine :

l'acide cholique (synthèse de Fieser et Newman (121)) et l'acide désoxycholique (synthèses de Wieland (410) et de Cook (78)).

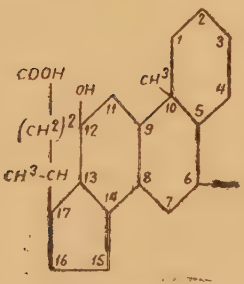


Méthylcholanthrène

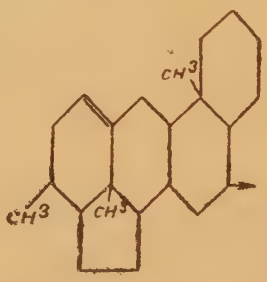


Cholanthrène

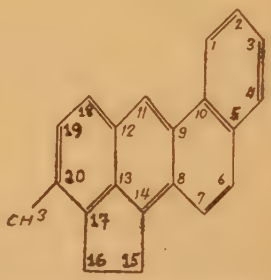
Voici le schéma de la synthèse à partir de l'acide désoxycholique :



Acide désoxycholique



Déhydronorcholène



Méthylcholanthrène

Les réactions intervenant dans cette synthèse sont des réactions relativement simples :

Une cyclisation et une déshydrogénation.

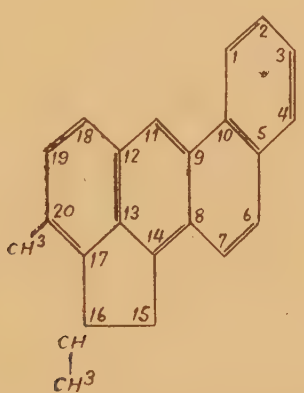
Si l'organisme est capable de les réaliser, et on sait déjà par l'étude des hormones sexuelles qu'il peut déshydrogéner des cycles hydro-aromatiques (*), rien ne s'oppose à admettre la génèse dans l'organisme de composés cancérigènes du type méthylcholanthrène à partir des acides biliaires et de leur substance mère : le cholestérol. L'obtention synthétique du méthylcholanthrène à partir des acides biliaires a été le premier argument en faveur de l'hypothèse d'une synthèse de composés cancérigènes dans l'organisme.

(*) Bernhard K. (26) a démontré que l'acide cyclohexanecarbonique est métabolisé en acide benzoïque chez l'Homme, le Chien et le Lapin. Tout récemment, Dickens F. (95) a obtenu la même transformation par action de coupes de foie de Lapin sur l'acide cyclohexanecarbonique. D'autres dérivés de l'acide cyclohexanecarbonique (acide hexahydrohippurique et hexahydrobenzamide) sont également aromatisés.

Le cholanthrène et le méthylcholanthrène peuvent être considérés comme dérivés du 1.2. benzanthracène par accolement en 5.10 d'un cycle pentagonal avec, en plus pour le méthylcholanthrène, un groupe CH_3 en 6. Aussi Cook, d'après le simple examen de la formule du méthylcholanthrène, avait-il pu annoncer, en juin 1933, que ce corps devait être cancérigène, ce qu'il ne tarda pas à démontrer en collaboration avec Haslewood (78). Il s'agissait d'un corps très actif, puisqu'ils obtinrent, chez la Souris, un cas de cancer cutané après badigeonnages, en 75 jours. Par ailleurs, avec ce dérivé, Bachmann, Cook, Dansi, de Worms, Haslewood, Hewett et Robinson (9) parvinrent à surmonter la résistance de l'épiderme du Rat à l'égard des cancérigènes chimiques; ils obtinrent, sur 22 animaux traités, deux cas d'épithéliomas, après 461 et 657 jours.

Le cholanthrène étant presque aussi cancérigène que le méthylcholanthrène, le groupe méthyle surajouté ne paraît avoir qu'une très faible influence.

Si, dans le méthylcholanthrène, on introduit dans le cycle pentagonal un nouveau groupe CH_3 substituant, on fait baisser l'activité cancérigène. C'est ainsi que le 16.20 diméthylcholanthrène (numérotage emprunté à celui admis pour les stérols) est trois fois moins actif que le 20 méthylcholanthrène.



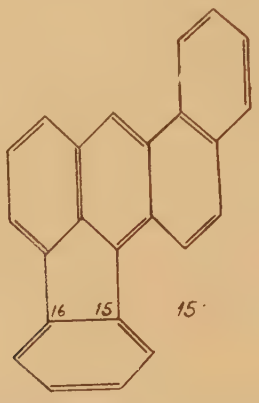
16.20 Diméthylcholanthrène

Si l'on accole au cycle pentagonal du méthylcholanthrène un nouveau cycle hexagonal, l'activité cancérigène s'atténue considérablement.

Par exemple, le 15.16 benzdéhydrocholanthrène est pratiquement dépourvu d'activité.

On retrouve donc ici l'influence néfaste sur l'activité cancérigène de l'augmentation de la complexité moléculaire constatée avec le 1.2.5.6 dibenzanthracène.

Il est intéressant de noter que l'hydrogénation du méthylcholanthrène ou du cholanthrène supprime leur activité cancérigène. L'hexahydrométhylcholanthrène, le dodécahydrocholanthrène et le déhydronorcholène, précurseur hydrogéné du méthylcholanthrène dans sa synthèse à partir de l'acide désoxycholique, sont ainsi dépourvus d'action cancérigène. Il en est de même d'ailleurs du tétrahydrobenzopyrène.



15.16 Benzdéhydrocholanthrène

*
**

Nous en arrivons maintenant aux carbures cancérigènes qui dérivent du 1.2. benzanthracène par substitution de radicaux gras en divers points de la molécule. Cook et ses collaborateurs ont préparé un grand nombre de dérivés de ce type; ils ont mis en évidence l'influence particulièrement favorable des positions 6 et surtout 5. De nombreux dérivés du benzanthracène, substitués en d'autres points de la molécule, se sont montrés inactifs. Parmi les dérivés les plus actifs, nous citerons le 5. méthyl 1.2. benzanthracène, le 5.6. diméthyl 1.2. benzanthracène et le 6 isopropyl 1.2. benzanthracène, dont l'activité est toutefois nettement inférieure à celle des cholanthrènes et du 3.4 benzopyrène et même légèrement inférieure à celle du 1.2.5.6 dibenzanthracène.

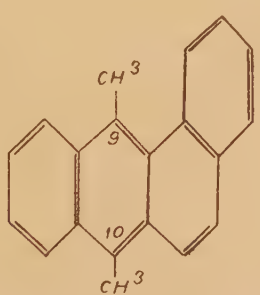
Il faut noter que, dans la série des 5 alcoyl 1.2. benzanthracènes, si les composés ayant plus de trois atomes de carbone dans la chaîne latérale conservent une certaine activité cancérigène pour l'épiderme, en revanche, ainsi que l'ont montré en 1940 et 1942, Badger, Cook, Hewett, Kennaway, Martin et Robinson (14), ils ne donnent pas de sarcomes par injection. C'est là un exemple, qu'on retrouve assez fréquemment, de molécules dont l'activité cancérigène varie selon que le test que l'on utilise pour mesurer cette activité s'adresse à l'épiderme traité par badigeonnages ou au tissu conjonctif soumis à des injections sous-cutanées.

C'est en étudiant, parallèlement à l'Ecole anglaise de Cook, l'in-

fluence de la substitution en divers points de la molécule du 1.2. benzanthracène, que Fieser, Fieser, Hershberg, Newman, Seligman et Shear (122) montrèrent que les substitutions aux positions méso 9 et 10 avaient une influence encore plus favorable que celles aux positions 5 et 6 sur l'activité des dérivés obtenus. Ils commencèrent par préparer les 4 ace — 1.2. benzanthracènes isomères connus. Trois sont cancérigènes ; ce sont ceux dans lesquels la substitution se produit aux positions méso dans la molécule : le 5.10. diméthylène 1.2. benzanthracène qui n'est pas autre chose que le cholanthrène, le 8.9. diméthylène 1.2 benzanthracène et le 4.10 diméthylène 1.2. benzanthracène. En revanche, le 3.4. diméthylène 1.2. benzanthracène, qui ne remplit pas ces conditions, s'avéra inactif.

Fieser et ses collaborateurs préparèrent alors le 9. méthyl 1.2. benzanthracène et trouvèrent qu'en badigeonnages cutanés à la Souris il avait une activité comparable à celle du 5. méthyl 1.2. benzanthracène. Bien plus, le 5.10 diméthyl 1.2 benzanthracène et le 10. méthyl 1.2. benzanthracène, synthétisés ensuite, se montrèrent sensiblement aussi cancérigènes que les cholanthrènes. Ces constatations permettaient de conclure que, si les positions 6 et surtout 5 sont favorables à l'augmentation du potentiel cancérigène, les positions méso 9 et 10 le sont encore plus; elles permettaient de conclure en outre que le pouvoir cancérigène des cholanthrènes n'est pas lié à un système pentacyclique, mais bien plutôt à l'accolement du cycle pentagonal surajouté en positions 5 et 10. Nous avons vu d'ailleurs que le 3.4. benzopyrène lui-même peut être considéré comme un dérivé du 1.2. benzanthracène avec accolement d'un cycle supplémentaire s'attachant au carbone méso 9.

C'est en continuant sur ces données que Bachmann et Chemerda (10) préparèrent le 9.10 diméthyl 1.2. benzanthracène, le 1.2. diméthyl 1.2. benzanthracène, le 5.9. diméthyl 1.2. benzanthracène (1.4 diméthyl 2.3. benzophénanthrène) et le 5.9.10. triméthyl 1.2. benzanthracène qui furent essayés sur la Souris par Bachmann, Kennaway et Kennaway (11).



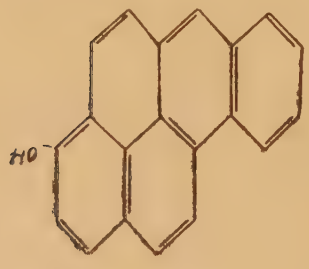
9.10. Diméthyl ou 1.2. Benzanthracène
1.4. Diméthyl. 2.3. Benzophénanthrène

Ces nouveaux corps s'avérèrent deux fois plus actifs, du point de vue délai d'apparition des tumeurs, que le méthylcholanthrène. Certaines tumeurs furent observées au bout de 35 jours seulement.

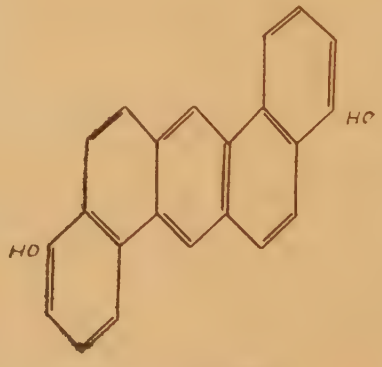
En résumé, les positions les plus favorables des substitutions pour faire apparaître l'activité cancérigène dans la molécule du 1.2. benzanthracène sont, dans l'ordre : les positions 10 et 9, puis 5 et 6. Cette règle est particulièrement nette dans le cas des dérivés monométhylés. Il faut noter que l'allongement de la chaîne substituante fait baisser l'activité. C'est ainsi que le 10 isopropyl 1.2. benzanthracène, étudié par Cook en 1932, n'a pas d'action cancérigène. C'est ainsi également que, comme l'ont montré Badger, Cook, Hewett, Kennaway, Kennaway, Martin et Robinson (14), le 5 n butyl, le 5 n amyl, le 5 n hexyl et le 5 n heptyl 1.2 benzanthracènes, s'ils sont faiblement actifs dans les tests cutanés, sont inactifs en injections sous-cutanées.

Si, au lieu d'une substitution, on en effectue deux, chacune à des positions privilégiées, on a une augmentation de l'activité cancérigène : le 9.10., le 5.10 et le 5.9. diméthyl 1.2. benzanthracène sont ainsi très actifs. En revanche, si la deuxième substitution porte sur une position non privilégiée, il se produit une diminution de l'activité cancérigène. C'est ainsi que le 6.7. diméthylbenzanthracène est beaucoup moins actif que le 6 méthyl et que le 1.10 diméthyl est à peu près inactif.

L'introduction de groupes polaires OH, OCH_3, NH_2, etc., exerce une influence défavorable sur l'activité cancérigène; c'est ainsi que le 3 amino 1.2 benzanthracène, le 3. hydroxy 1.2. benzanthracène et le 10 amino benzanthracène sont inactifs. On retrouve le même phénomène dans le cas des carbures cancérigènes pentacycliques. C'est ainsi que le 5 hydroxy 3.4 benzopyrène, les 3 ou 6 cyano-20 méthylcholanthrènes et leurs isologues chlorés sont inactifs.



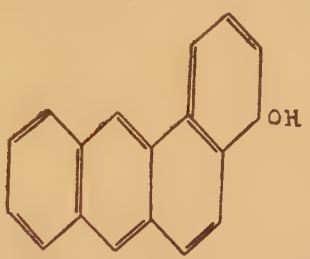
4' 8' Dihydroxy.
1.2.5.6 Dibenzanthracène



8. Hydroxy.
3.4. Benzopyrène

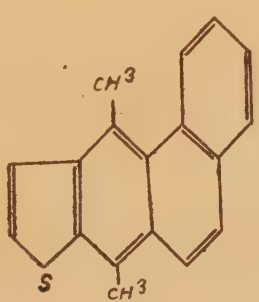
Il semble d'ailleurs que l'organisme utilise l'introduction d'un de ces groupes polaires : le groupe oxhydryle, dans les molécules cancérigènes, pour les détoxiquer. C'est ainsi que le 1.2.5.6 dibenzanthracène est transformé, chez le Rat et la Souris, en dérivé dihydroxylé en 4' 8' ainsi que l'ont montré les travaux de Boyland, Lévi, Mawson et Roe (44), Dobriner, Rhoads et Lavin (99), et Berenblum, Crowfoot, Holiday et Schoental (21). C'est ainsi également que le 3.4. benzopyrène est transformé chez les mêmes animaux en un dérivé monohydroxylé en 8, ainsi que l'ont montré les travaux de Chalmers et Crowfoot (67 *bis*), Chalmers (67), Weigert (403), Berenblum et Schoental (22), Berenblum, Crowfoot, Holiday et Schoental (21) et, enfin, Weigert et Mottram (404).

Le 1.2. benzanthracène lui-même est transformé dans l'organisme (Rat et Souris) en dérivé hydroxylé en 4'.



4' Hydroxy. 1.2. Benzanthracène

Pour en terminer avec la question des rapports entre la constitution chimique et l'activité cancérigène dans cette série des composés dérivés du 1.2. benzanthracène, nous mentionnerons que Sandin et Fieser (329) ont synthétisé l'isologue thiofénique du 9.10 diméthyl 1.2. benzanthracène qui résulte du remplacement du cycle benzénique porteur des carbones 5.6.7. et 8 dans la molécule du 1.2. benzanthracène par un cycle pentagonal thiofénique.



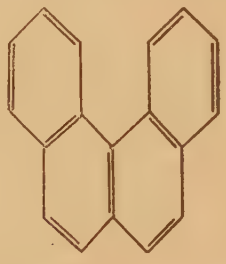
4.9. Diméthyl. 5.6. Benzothiophénanthrène

Ce dérivé, qui est le 4.9. diméthyl 5.6. benzothiophénanthrène, s'est montré sensiblement aussi cancérigène que le 9.10 diméthyl 1.2. benzanthracène. L'intérêt de ce nouveau corps est considérable, si l'on songe qu'on peut y introduire du soufre radio-actif et ainsi suivre facilement sa destinée dans l'organisme (162) et (111).

2° Composés cancérigènes non azotés ne dérivant pas du 1.2. benzanthracène

Un certain nombre de carbures cancérigènes ne renferment pas dans leur molécule le squelette du 1.2. benzanthracène. Ce sont :

a) Le 3.4. benzophénanthrène, dont, en 1942, Badger, Cook et leurs collaborateurs (14) ont préparé et essayé un certain nombre de dérivés.



3.4. Benzophénanthrène

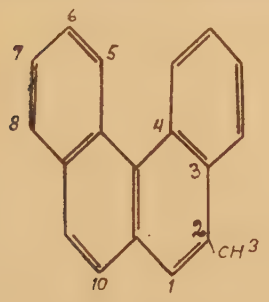
Le carbure en lui-même n'est que faiblement actif. De même, ses dérivés méthylés en 6, 7, 8, mais les dérivés méthylés en 1 et en 2' et le dérivé méthylé en 2 sont plus actifs. Il faut noter qu'ils ont tendance à donner plus facilement des épithéliomas que des sarcomes.

Les positions favorables de substitution, dans le cas du 3.4. benzophénanthrène sont donc les positions 1. et 2. Si l'on effectue deux substitutions, on observe une disparition de l'activité. C'est ainsi que le 2.9. diméthyl et le 2.9. isopropylméthyl 3.4. benzophénanthrène sont inactifs (274).

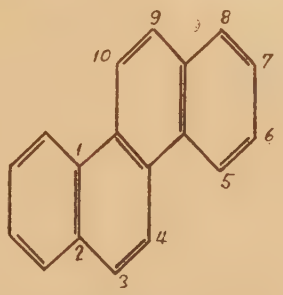
En liaison avec l'activité du 3.4. benzophénanthrène et surtout de ses dérivés, remarquons que le 1.2. benzanthracène peut être considéré comme le 1.2. benzophénanthrène. Nous avons vu qu'il n'était pas cancérigène. Il en est de même du chrysène qui est le 1.2. benzophénanthrène.

Twort et Fulton (388) et Bottomley et Twort (41) l'avaient trouvé faiblement cancérigène, mais leurs résultats positifs étaient dus à des impuretés car, avec un produit pur, Barry et Cook (17) n'ont obtenu, par injections sous-cutanées en solution dans du lard, aucune tumeur chez la Souris; leurs résultats ont été récemment confirmés par Shear et Leither (349). En revanche, certains dérivés du chrysène

sont actifs, en particulier : le 6. méthylchrysène, étudié par Shear et Leiter (349) par injections sous-cutanées chez la Souris (une tumeur sur 20 animaux) ; le 5.6. diméthylchrysène, étudié par Hewett (164) et numéroté par lui 1.2. diméthylchrysène, qui s'est montré très actif en badigeonnages cutanés chez la Souris; enfin, le 5. méthylchrysène qui, dans les expériences de Dunlap et Warren (112), s'est montré



2. Méthyl 3.4. Benzophénanthrène

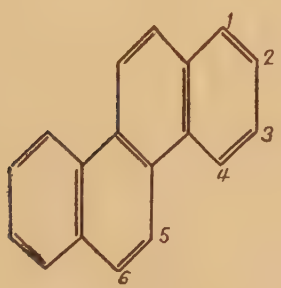


1.2. Benzophénanthrène (Chrysène)

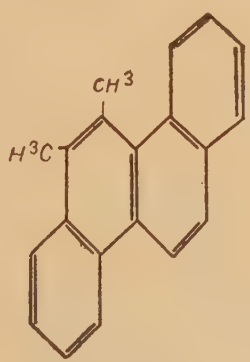
capable de produire des sarcomes après une injection sous-cutanée unique de 0 cm³ 2 d'une solution dans le tricaprylide à une concentration de 1 à 4 pour 1.000; son activité cancérigène est intermédiaire entre celles du 20 méthylcholanthrène et du 1.2.5.6 dibenzanthracène.

D'après Dunlap et Warren (112), le 4.5. méthylènechrysène et le 5.6. diméthylchrysène sont beaucoup moins actifs ; le 4. méthylchrysène et le 4.5. diméthylchrysène sont inactifs ou très peu actifs.

L'intérêt de l'activité de certains dérivés du chrysène, c'est la parenté de leur structure chimique avec celle des hormones naturelles du groupe des stéroïdes et en particulier les hormones œstrogènes.

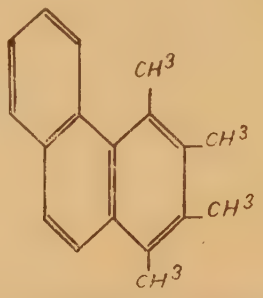


Chrysène (*Notation américaine*)



1.2. Diméthylchrysène (*Notation de* Hieger)

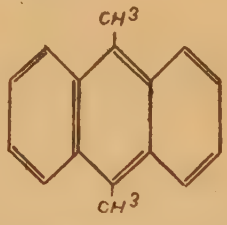
b) Le 1.2.3.4. tétraméthylphénanthrène, préparé par Hewett et Martin (165), présente une faible activité.



1.2.3.4 Tétraméthylphénanthrène

c) Les diméthylanthracènes.

Kennaway, Kennaway et Warren (195 *bis*), se basant sur les résultats qui avaient montré l'importance des substitutions aux positions méso 9 et 10 sur la molécule du 1.2. benzanthracène pour faire apparaître l'activité cancérigène, eurent l'idée que de telles substitutions pourraient être essayées avec fruit sur des molécules hydrocarbonées encore plus simples. Ils préparèrent alors le 9.10 diméthylanthracène en même temps que quatre isomères correspondants en 1.2, 1.3, 1.4 et 2.3. Ils essayèrent ces dérivés sur la Souris en badigeonnages cutanés, en injections sous-cutanées (en solution dans le glycérol ou dans l'huile de Sésame) et enfin par insertions de cristaux.



9.10. Diméthylanthracène

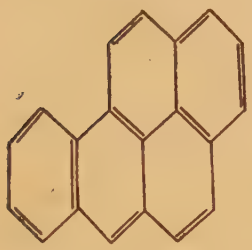
De fait, le 9.10 diméthylanthracène provoque, en applications cutanées, des épithéliomas (4 sur 40 animaux en 13, 18, 20 et 22 mois). Il est, en revanche, inactif en injections sous-cutanées.

d) *L'α Ethyl β sec. butylstilbène.*

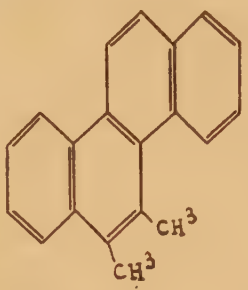
Ce dérivé a été étudié par Dodds, Lawson et Williams (103) par applications en solution benzénique sur la peau de la Souris. Sur 50 animaux mis en expérience, deux ont présenté, en 12 à 15 mois, des tumeurs (un épithélioma et un sarcome).

Ce résultat est fort intéressant pour deux raisons principales :

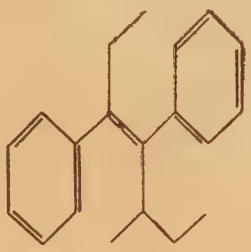
1° Il s'agit d'un composé qui présente des propriétés œstrogènes ana-



3.4. Benzopyrène



Diméthylchrysène



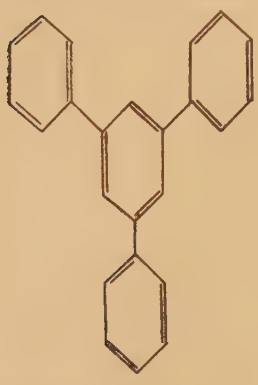
α Ethyl β sec. Butylstilbène

logues à celles des hormones sexuelles femelles dont le type est la folliculine ou œstrone. Si l'on remarque, avec Cook, que la prolifération cellulaire qui caractérise l'œstrus des Rongeurs, rappelle, par certains côtés, les étapes précoces d'une croissance maligne, on voit tout l'intérêt d'une telle remarque. D'autant que certains carbures cancérigènes, par exemple le 5.6. cyclopentenobenzanthracène et le 3.4. benzopyrène, manifestent une faible activité œstrogène et que, par ailleurs, les hormones œstrogènes naturelles, et en particulier la folliculine, ont pu favoriser l'apparition de certains cancers, en intervenant indirectement pour modifier l'aptitude héréditaire au cancer spontané de la mamelle.

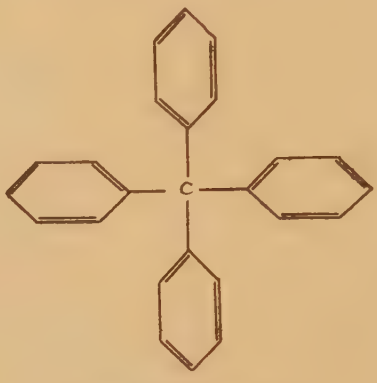
2° Il s'agit d'un composé ne présentant que deux cycles benzéniques; mais, de ce point de vue, il faut remarquer, avec Dodds et ses collaborateurs (104), que si, au premier abord, sa structure paraît très éloignée de celle des carbures cancérigènes que nous avons rencontrés jusqu'à présent, il n'en est plus de même si l'on écrit, comme nous l'avons fait plus haut, la formule de ce dérivé de façon à faire apparaître l'existence de « noyaux potentiels ». Il se rapproche alors d'une façon nette non seulement de l'œstrone ou folliculine, mais encore du benzopyrène et des dérivés chrysèniques. Le facteur prépondérant du point de vue de l'activité physiologique serait, d'après Dodds, la disposition des atomes dans l'espace, en un mot la configuration spatiale des molécules. Cette notion, tout à fait nouvelle et pleine de perspectives, est d'ailleurs applicable à d'autres domaines pharmacodynamiques, comme l'a très bien souligné Moreau (264), dans une conférence récente sur les nouveautés thérapeutiques.

Nous n'avons pas compris, dans l'énumération des carbures cancérigènes, deux composés tétracycliques étudiés par Morton, Clapp et Branch (266) : le s-triphénylbenzène et le tétraphénylméthane, dont

ces auteurs avaient signalé, en 1936, la faible activité cancérigène chez la Souris, soit en applications cutanées de solutions benzéniques, soit en injections sous-cutanées de solutions huileuses; en effet, l'activité de ces composés n'a pas été retrouvée par les autres expérimentateurs, et en particulier par SHEAR (350).



s-TRIPHÉNYLBENZÈNE



TÉTRAPHÉNYLMÉTHANE

B) LES COMPOSÉS CANCÉRIGÈNES AZOTÉS

Si nous laissons de côté, étant donné leur caractère tout à fait particulier, les substances du groupe des virus-protéïdes, sur lesquelles nous avons d'ailleurs publié une revue générale (383), les molécules cancérigènes azotées peuvent être classées en trois séries principales :

La série des Naphtylamines;

La série des Azoïques;

La série des Composés polyhétérocycliques.*

I. — Les Naphtylamines

La découverte des propriétés cancérigènes dans certaines conditions de la β naphtylamine découle de l'observation de tumeurs vésicales chez

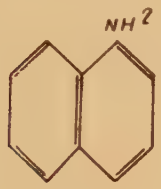
* Tout récemment, HADDOW A., HARRIS R. J. C., KON G. A. R. et Miss ROE E. M. F. (XIth International Congress of pure and applied chemistry; London; 17-24 juillet 1947 et Fourth international Cancer research Congress, Saint-Louis, Missouri, U. S. A.; 2-7 septembre 1947) ont signalé les propriétés cancérigènes vis-à-vis du Rat du 4. aminostilbène et de certains de ses dérivés (4. acétylamino; 4. diméthylamino; 2' méthyl.4.diméthylamino et 4. diéthylaminostilbènes). Ces composés exercent, à l'inverse, dans d'autres conditions, une action anticancérigène. (Expérimentation avec le carcinome de Walker 256 du Rat.)

Les auteurs anglais ont, à la suite de ces premiers résultats, entrepris une étude systématique des aminodiaryléthylènes, du point de vue de leur action cancérigène ou anticancérigène.

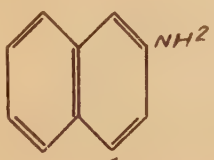
les ouvriers des matières colorantes d'aniline : travaux de Rehn (303), Nassauer (271), Leuenberger (237), Lewin (239), Curschmann (87), entre autres.

Elle a été démontrée expérimentalement par Schaer (337) sur le Lapin, auquel il faisait respirer de l'air saturé de l'amine aromatique; par Perlmann et Staehler (285), également sur le Lapin, mais en injections sous-cutanées; par Hueper, Wiley et Wolfe (173), sur la Chienne, soumise à des injections sous-cutanées (13 tumeurs vésicales sur 16 animaux expérimentés); et enfin par Bonser (39), également chez le Chien, avec le produit administré *per os*.

L'α naphtylamine est beaucoup moins efficace et, employée pure, n'a donné que des proliférations sans caractères de malignité.



α Naphtylamine



β Naphtylamine

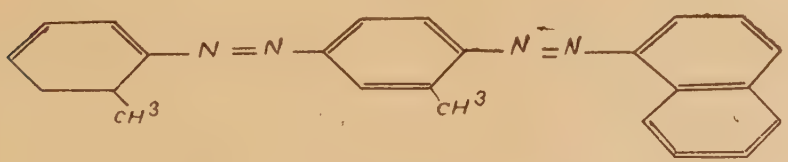
Notons que Wiley (411) a montré que, chez le Chien, la β naphtylamine est excrétée dans l'urine sous forme de dérivé hydroxylé en 1. Nous retrouvons un mécanisme de détoxication comparable à celui observé avec les carbures cancérigènes.

Comme produit se rattachant aux naphtylamines, signalé comme ayant des propriétés cancérigènes, il faut citer l'α-naphtoquinone qui, d'après Takisawa (375), provoque, chez la Souris, en badigeonnages cutanés, la formation d'épithéliomas.

II. — Les Azoïques

LE ROUGE ECARLATE

Les découvertes, dans cette série, ont eu pour point de départ une observation de Fischer (127), en 1906. Cet auteur obtint, avec une matière colorante, le Rouge écarlate, injectée en solution huileuse sous la peau de l'oreille du Lapin, des modifications histologiques rappelant

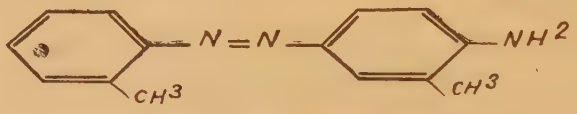


Rouge écarlate

absolument celles d'un épithélioma pavimenteux. Les résultats de Fischer furent vérifiés par de nombreux expérimentateurs et, en particulier, par Beuthin (28), Haga (156) et Yamagiwa et Ohno (420). En 1924, par ailleurs, Schmidt (342) signala que l'administration *per os*, à la Souris, de Rouge écarlate, provoque la formation d'adénomes et de sarcomes au niveau du foie. Les résultats de Schmidt ont été confirmés par Korteweg (210).

L'O. AMINO-AZOTOLUENE

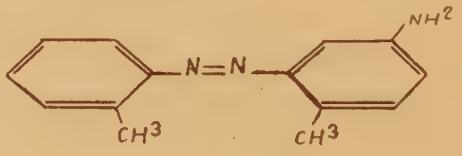
Partant de l'hypothèse que l'orthoaminoazotoluène représente la partie active de la molécule du Rouge écarlate pour exciter la prolifération cellulaire, l'auteur japonais Yosida (42) démontra, en 1932, qu'effectivement ce composé, administré au Rat par voies buccale ou sous-cutanée, exerçait son action cancérigène de façon élective sur le foie (production d'hépatomes transplantables). Ce résultat était du plus haut intérêt, car c'était la première fois qu'on réussissait à produire expérimentalement une tumeur d'un tissu parenchymateux autre que le poumon, loin du point d'injection.



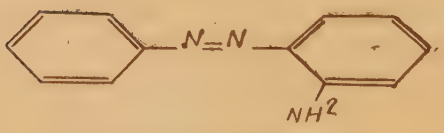
Ortho-amino-azotoluène

Avec Sasaki, en 1935 (334), Yoshida montra que, dans les mêmes conditions, des azoïques très voisins : le paraaminoazotoluène, l'ortho et le paraaminoazobenzène, donnaient des résultats négatifs.

Les conclusions de Yoshida furent confirmées sur la Souris par Nishiyama (277), Shear (351), Kinosita (199) et Kirby (201).



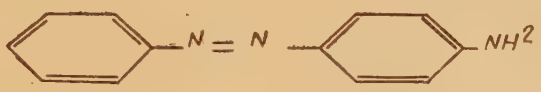
Para-aminoazotoluène



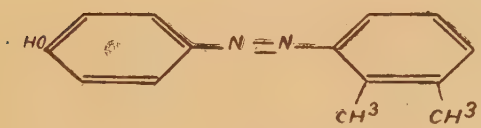
Ortho-aminoazobenzène

Il est intéressant de souligner la localisation élective au niveau du foie des tumeurs produites par l'orthoaminoazotoluène. Il faut cependant noter que Shear (351) a pu, dans certains cas, observer des cancers de la vessie et que Andervont et ses collaborateurs (2) ont pu provoquer, chez la Souris, après administration sous-cutanée, des tumeurs pulmonaires et même des sarcomes sous-cutanés. Law (230) a également obtenu des fibrosarcomes chez la Souris. En revanche, l'utilisation de l'azoïque en badigeonnages n'a pas permis d'obtenir des tumeurs cutanées.

L'activité cancérigène de l'orthoaminoazotoluène est maintenue après acétylation.



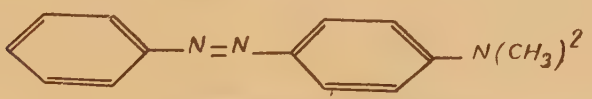
Para-aminoazobenzène



4' Oxy 2.3. Diméthylazobenzène

Nagao (270) a constaté que, si l'on substitue un groupement hydroxyle au groupe aminé de l'orthoaminoazotoluène, le pouvoir cancérigène de ce produit sur le foie disparaît, mais que le composé ainsi obtenu, le 4' oxy 2.3. diméthylazobenzène, donne, chez le Rat, de l'épaississement et de la métaplasie de l'épithélium vésical, avec formation de papillomes.

LE PARADIMETHYLAMINOAZOBENZENE



P. Diméthylaminoazobenzène

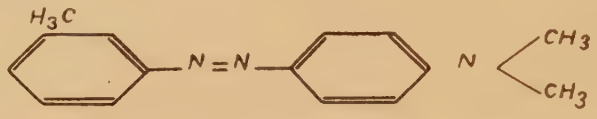
L'action cancérigène de cet azoïque, administré par voie digestive, a été mise en évidence sur le Rat en 1937, par Kinosita (200) ; l'activité est du même ordre que celle de l'orthoaminonazotoluène, mais nettement plus marquée en ce qui concerne l'action sur le foie. En revanche, aucune tumeur de la vessie n'a été rencontrée chez les milliers de Rats ayant servi aux expériences.

L'action cancérigène du paradiméthylaminoazobenzène a été confirmée en utilisant la voie cutanée, par Maruya et Tamaka (256). La Souris est

réceptive, moins toutefois que le Rat. La Poule et le Lapin sont réfractaires.

L'activité cancérigène du paradiméthylaminoazobenzène est d'autant plus intéressante à noter qu'il s'agit d'une substance utilisée fréquemment dans le commerce sous le nom de « Jaune de beurre » pour colorer artificiellement certaines matières grasses alimentaires. Naturellement, à la suite de ces découvertes, son emploi alimentaire a été interdit.

Miller et Bauman (261), en 1945, étudièrent une série de molécules proches de celles du paradiméthylaminoazobenzène. Parmi les composés trouvés actifs, nous citerons, dans l'ordre de leur activité décroissante : le *m'*-méthyl-*p*-diméthylaminoazobenzène; le *p*-monométhylaminoazobenzène, l'*o*-méthyl-*p*-diméthylaminoazobenzène et le *p'*-méthyl-*p*-diméthylaminoazobenzène.

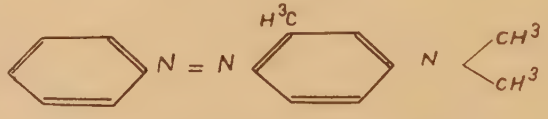


m'-Méthyl-*p*. diméthylaminoazobenzène

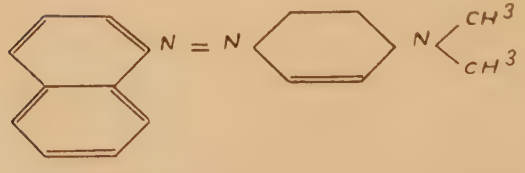
p. Monométhylaminoazobenzène

Le *m'*-méthyl-*p*-diméthylaminoazobenzène s'est révélé plus actif que le *p*-diméthylaminoazobenzène; le *p'*-monométhylaminoazobenzène a sensiblement la même activité que ce dernier.

En revanche, l'*o*. méthyl-*p*-diméthylaminoazobenzène, le *p*-diméthylaminophénylazo 1. naphtalène, la N-N-diméthyl-N'-benzal-*p*-phénylènedia-



o- Méthyl-*p*-diméthylaminoazobenzène

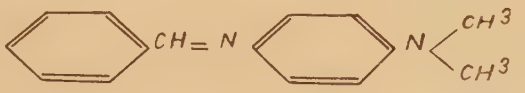


p. Diméthylaminophénylazo-1. naphtalène

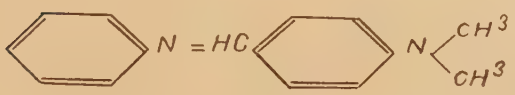
mine est excrétée dans l'urine sous forme de dérivé hydroxylé en I. Nous

mine, la *p*-diméthylaminobenzalaniline, la N-N-diméthyl-*p*-phénylènediamine et, enfin, l'aniline, également essayés dans ces expériences, se montrèrent inactifs.

Les résultats de Miller et Baumann ont été confirmés par Sugiura, Halter, Kensler et Rhoads (368), qui ont noté la haute activité du N-méthyl-*p*-aminoazobenzène et souligné qu'en remplaçant le groupe CH_3 par des homologues supérieurs, on faisait baisser l'activité cancérigène.



N'N-Diméthyl-N'benzalphénylènediamine



p. Diméthylaminobenzalaniline

On a étudié le sort, dans l'organisme, du *p.* diméthylaminoazobenzène. Chez le Rat, soumis à l'administration *per os* du produit, Stevenson, Dobriner *et* Rhoads (385) ont isolé la *p.* phénylènediamine et le *p.* aminophénol et leurs dérivés acétylés. Ils pensent que le premier stade de la dégradation de l'azoïque est la rupture au niveau de la liaison N = N, avec production de N-N-diméthyl *p*-phénylènediamine qui est ensuite déméthylée en *p.* phénylènediamine.

Il faut noter que le régime alimentaire semble avoir une grande influence sur la production des cancers hépatiques par les azoïques. Ces cancers s'obtiennent plus régulièrement et plus rapidement au Japon, où les animaux sont nourris avec du riz, que dans les autres pays du monde où ils sont nourris avec du blé.

LES AZONAPHTALENES

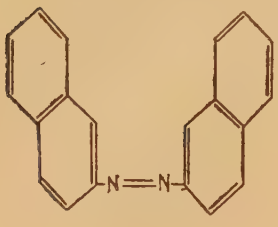
Cook et ses collaborateurs (79) préparèrent des azonaphtalènes en vue de rechercher leur action sur la vessie, d'après cette idée directrice que de tels corps devaient se former par l'oxydation des α et β naphtylamines.

Trois composés furent spécialement étudiés : le 1.1', le 2.2' et le 1.2' azonaphtalènes.

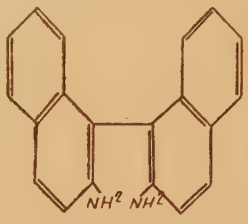
Leur action cancérigène fut essayée sur la Souris par trois techniques : applications cutanées, injections sous-cutanées, administration *per os*.

Si aucun cancer de la vessie ne put être obtenu, en revanche il se produisit, avec le 2.2' azonaphtalène, de nombreuses tumeurs du foie (hépatomes et cholangiomes). Les deux autres composés ne provoquèrent que des réactions non tumorales.

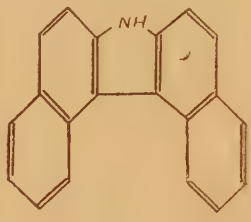
Un dérivé du 2.2' azonaphtalène, le 2.2'-diamino 1.1' dinaphtyle.



2.2' Azonaphtalène



2.2'-Diamino-1.1' Dinaphtyle



3.4.5.6-Dibenzocarbazol

a été, pour des raisons théoriques, préparé et essayé; il provoque également des tumeurs du foie chez la Souris.

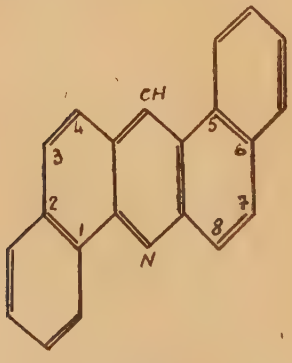
Il est remarquable que chacun des deux composés soit inactif dans les mêmes conditions vis-à-vis du Rat.

Il faut noter, enfin, que les auteurs anglais ont essayé, sur la Souris *per os*, toute une série d'azoïques hydrosolubles employés de façon courante comme colorants de substances alimentaires; ils n'ont observé aucune activité cancérigène.

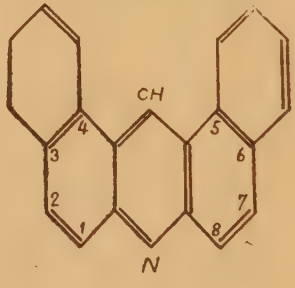
III. — Composés azotés polyhétérocycliques

LES DIBENZACRIDINES

Ces composés se rattachent au 1.2.5.6 dibenzanthracène, dont ils dérivent par substitution d'un carbone méso du carbure par un atome d'azote.



1.2.5.6. Dibenzacridine



3.4.5.6. Dibenzacridine

Deux dibenzacridines ont été étudiées, en 1935, par Barry, Cook et leurs collaborateurs (16) : la 1.2.5.6 dibenzacridine et la 3.4.5.6 dibenzacridine.

Si l'on examine la formule de ces composés, on voit que la 1.2.5.6 dibenzacridine correspond au 1.2.5.6. dibenzanthracène et la 3.4.5.6. dibenzacridine au 1.2.7.8. dibenzanthracène. Or, c'est la 3.4.5.6. dibenzacridine qui est la plus active du point de vue cancérigène, c'est-à-dire que, par rapport aux carbures correspondants, les activités relatives sont inversées.

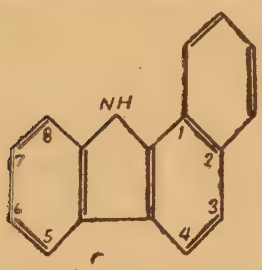
Ces résultats de Cook et ses collaborateurs avaient été obtenus par badigeonnages cutanés sur la Souris. Ils furent confirmés par Rondoni et Corbellini (317). Mais, en 1937, Backmann, Cook et leurs collaborateurs (9), essayant ces dérivés sur le même animal, mais par injections sous-cutanées d'une solution huileuse, montrèrent, qu'à l'inverse du cas précédent, la 1.2.5.6. dibenzacridine donnait des sarcomes (8 sur 19 animaux traités) et la 3.4.5.6. dibenzacridine ne donnait rien.

Notons que l'acridine et ses dérivés comme la proflavine (sulfate d'aminoacridine) et l'acriflavine (chlorure de diaminométhylacridinium) ne manifestent aucune activité du même ordre.

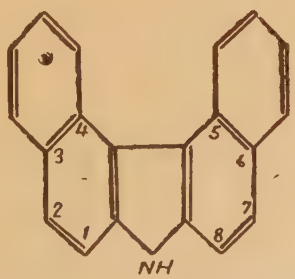
Enfin, comme nous l'avons vu, les dibenzophénazines, qui résultent du remplacement, non plus d'un, mais des deux carbones méso des 1.2.5.6 dibenzanthracènes, sont également inactives.

LES DIBENZOCARBAZOLS

En 1927, Maisin, Desmedt et Jacqmin (251) avaient signalé l'obtention, chez la Souris, d'un épithélioma sébacé avec du carbazol. Mais ce résultat positif unique, obtenu d'ailleurs après deux ans et demi, paraît devoir être attribué aux impuretés souillant le produit commercial. En revanche, certains dérivés du carbazol ont une activité cancérigène certaine, en particulier le 1.2.5.6 dibenzocarbazol et surtout le 3.4.5.6 dibenzocarbazol (analogie avec les dibenzacridines); le 1.2.7.8. dibenzocarbazol a une action inconstante.

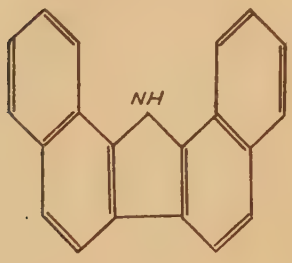


1.2. Benzocarbazol

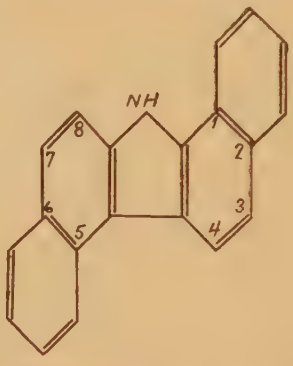


3.4.5.6. Dibenzocarbazol

Remarquons que les dibenzocarbazols résultent du remplacement, dans les dibenzofluorènes, du CH_2 du cycle pentagonal central par un groupe NH.



1.2.7.8. Dibenzocarbazol



1.2.5.6. Dibenzocarbazol

L'action cancérigène du 3.4.5.6. dibenzocarbazol est intéressante à souligner, car ce corps dérive facilement de la β naphtylamine qu'on considère, ainsi que nous l'avons vu, comme responsable des cancers de la vessie frappant les ouvriers des matières colorantes.

L'activité cancérigène des dibenzocarbazols a été mise en évidence par Boyland et Brues (45), qui les ont essayés en badigeonnages cutanés sur la Souris (production d'épithéliomas). Leurs résultats ont été confirmés par Strong, Smith et Gardner (366), en 1938, aussi bien en applications cutanées qu'en injections sous-cutanées (sarcomes) (*).

Tous ces auteurs notèrent, et leurs résultats, de ce point de vue, furent confirmés par Boyland et Mawson (46), qu'en dehors des tumeurs cutanées et des sarcomes, il se produisait, au niveau du foie, des réactions prolifératives. Ainsi, comme le souligne Lacassagne (215), les dibenzocarbazols occuperaient, non seulement du point de vue chimique, mais aussi du point de vue physio-pathologique, une place intermédiaire entr les substances azotées, qui sont très actives sur le foie et très peu sur l'épiderme et le tissu conjonctif et, d'autre part, les hydrocarbures polycycliques qui provoquent facilement des épithéliomas de la peau et des sarcomes, sans que se produisent de proliférations épithéliales dans le foie.

Si nous reppelons que le 2.2' diamino 1.1' dinaphtyle, très proche, du point de vue de sa structure, du 3.4.5.6. dibenzocarbazol, produit facilement des hépatomes, on voit que la fermeture du cycle par laquelle on passe du 2.2' diamino 1.1' dinaphtyle au 3.4.5.6. dibenzocarbazol,

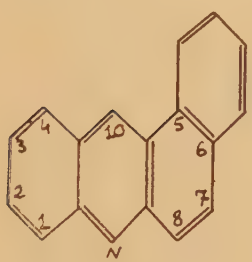
(*) En rapport avec l'activité des dibenzocarbazols, signalons que Schurch O. et Winterstein A. (346) ont observé que le 1.2. benzocarbazol stimulait la prolifération des cellules épithéliales.

si elle a entraîné la diminution de l'action cancérigène sur le foie, a fait apparaître la propriété de produire des épithéliomas cutanés que ne possèdent ni les azoïques, ni le diaminodinaphtyle.

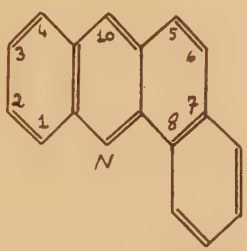
LES BENZACRIDINES

En 1943, à la suite des résultats obtenus dans l'étude de l'inhibition du pouvoir cancérigène des hydrocarbures aromatiques par diverses substances cancérigènes de configuration voisine, Lacassagne, Buu-Hoï, Lecocq et Rudali (216) furent conduits à préparer toute une série de composés possédant le noyau de la 5.6 benzacridine ou celui de la 7.8. benzacridine et à mettre ainsi en évidence le pouvoir cancérigène cutané de certains d'entre eux.

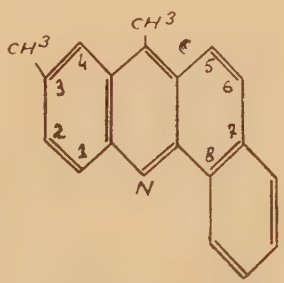
Plusieurs homologues de la 7.8. benzacridine provoquent la cancérisation de l'épiderme avec une grande fréquence, alors que leurs isomères dérivés de la 5.6. benzacridine sont inactifs ou faiblement actifs de ce point de vue.



5.6. Benzacridine



7.8. Benzacridine



3.10. Diméthyl 7.8. Benzacridine

Certains présentent un pouvoir cancérigène voisin de celui du méthylcholanthrène, à la fois du point de vue de la durée de la latence et du point de vue du pourcentage des tumeurs. Ce pouvoir est même supérieur, dans le cas de la 3.10. diméthyl 7.8 benzacridine.

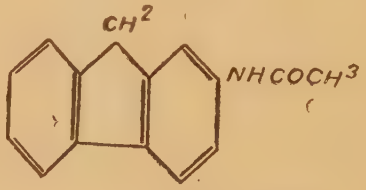
Ces dérivés sont également actifs par la voie sous-cutanée (217).

Il est intéressant de noter que les relations entre la constitution moléculaire et l'activité physiologique chez ces composés sont généralement parallèles à celles que l'on observe dans la série du 1.2. benzanthracène. En particulier, à l'activité très forte du 10. méthyl 1.2. benzanthracène correspond celle de la 10 méthyl 7.8. benzacridine.

LE N-ACETYLAMINO 2 FLUORENE

En 1941, Wilson, de Eds et Cox (412), étudiant la toxicité du 2. acétylaminofluorène, dont l'emploi comme insecticide était envisagé,

signalèrent que cette substance, administrée *per os* au Rat, provoquait, en 3 ou 4 mois, la formation de cancers de sièges et d'espèces variées (peau, foie, rein, pancréas, poumon et surtout vessie) ; leurs résultats furent confirmés sur le Rat et sur la Souris par Bielschowsky (29), puis par Armstrong et Bonser (6).



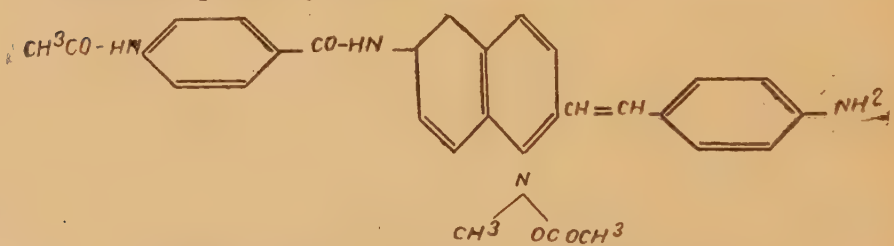
2. Acétylaminofluorène

Chez le Rat soumis à l'ingestion du dérivé, Bielschowsky (30) a pu isoler le dérivé hydroxylé en 7.

Les dérivés quinoléiques

LE STYRYL 430

C'est au cours de recherches sur les corps susceptibles de guérir l'infection causée chez les Rongeurs (Rats et Souris) par *Trypanosoma Brucei* que Browning et ses collaborateurs (50) constatèrent que l'acétométhylate du 2. (*p*- aminostyryl) 6 (*p*. acétylamino-benzoylamino) quinoléinium, désigné dans leur nomenclature comme Styryl 430, provoquait, après injection à la Souris par voie sous-cutanée, l'apparition de sarcomes au point d'injection.



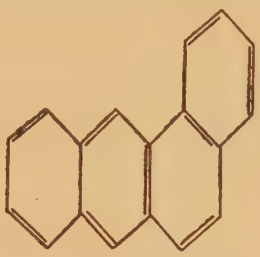
Acétométhylate du 2 (*p*. aminostyryl) 6 (*p*. acétylamino-benzoylaminoquinoléinium (Styryl 430).

Ce résultat fut confirmé en 1936 par Browning, Gulbransen et Niven (51), qui précisèrent qu'une seule injection du composé suffisait pour provoquer l'apparition d'un sarcome.

Le grand intérêt du produit réside dans son hydrosolubilité qui l'oppose aux autres agents chimiques cancérigènes qui sont pour la plupart liposolubles.

LA β ANTHRAQUINOLEINE

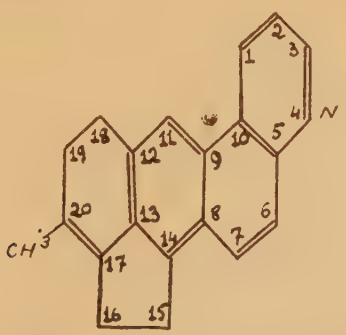
homologue azoté du 1.2. benzanthracène, provoquerait, d'après Sempronj et Morelli (347), des tumeurs du rein chez le Rat.



β. Anthraquinoléine

***

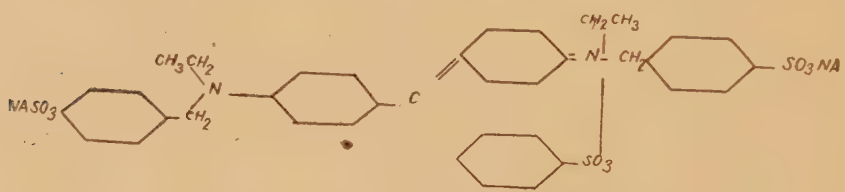
Après cette énumération des composés cancérigènes azotés actuellement connus, il nous faut signaler que, si l'on excepte les corps de la série benzacridinique, la 3.4.5.6. dibenzacridine, le 3.4.5.6. dibenzocarbazol et le 2. acétylaminofluorène, tous ces composés se montrent notablement moins actifs que leurs isologues purement hydrocarbonés ; nous avons vu un exemple type de ce fait en comparant à l'activité du 1.2.5.6. dibenzanthracène celle de la 1.2.5.6. dibenzophénazine. D'autre part, comme le soulignent Lacassagne et ses collaborateurs (216), il faut citer, de ce point de vue, le cas du 3.4. benzo 8 azaphénanthrène (isologue du 3.4. benzophénanthrène) qui a été reconnu par Joseph (189), comme étant inerte, celui de la pyrénoline (isologue du 3.4. benzopyrène) découverte par Jahoda (184) ; celui enfin du 20. méthyl 4 azacholanthrène (isologue azoté du méthylcholanthrène) préparé par Fieser et Hershberg (123) et qui ne semble pas, bien qu'il s'agisse d'un homologue de la β anthraquinoléine dont nous avons parlé, avoir été trouvé actif.



20. Méthyl. 4. Azacholanthrène

Pour être complet, il faut signaler qu'en 1943, Nettleship et Henshaw (272), ont signalé que l'injection répétée à la Souris de carbamate d'éthyle ou uréthane augmentait de façon nette le pourcentage d'adénomes pulmonaires spontanés. Cette observation fut confirmée par Henshaw et Meyer (163), Larsen et Heston (227), et enfin par Jaffe, aussi bien par voie orale que par injection intra-péritonéale, d'abord sur la Souris (182) puis, tout récemment sur le Rat (183), animal qui ne présente jamais spontanément d'adénomes pulmonaires. Etant donné l'emploi thérapeutique de cette substance, nous avons entrepris à l'Institut du Cancer des expériences de vérification sur ce sujet.

Remarquons également, qu'en 1937, Schiller (339) a obtenu des sarcomes chez le Rat par injection d'un colorant : le vert Lumière F. S. qui est le diéthyldibenzyldiaminotriphénylcarbinoltrisulfonate de sodium. Récemment, Harris (158) a confirmé cette action, mais il n'est pas certain que la partie active ne soit pas une impureté.



Vert Lumière S. F.
(d'ap. Conn (H. J.). *Biological Stains*, 4e édition.
Genève, New-York, 1940, p. 109)

Notons enfin, que Fieser et Campbell (124) ont eu l'idée de coupler deux corps appartenant à chacune des deux grandes séries de composés cancérigènes. Ils ont ainsi préparé le paranitrobenzène-azobenzopyrène. Le produit a été essayé par Dittmar (97) en injections sous-cutanées chez la Souris. Chez sept animaux sur quinze, il a obtenu, en quatre ou cinq mois, des tumeurs spéciales, de type hémangiosarcome, qui font penser à une affinité élective de la substance pour les endothéliums vasculaires.

Il nous paraît utile, pour compléter cet exposé, de donner un tableau (I) d'activité des principaux agents chimiques cancérigènes que nous empruntons à Iball (178). Les composés sont rangés dans l'ordre de leur activité cancérigène décroissante, celle-ci étant évaluée par un index numérique établi en tenant compte de deux critères : 1°) pourcentage de tumeurs provoquées (A) ; 2°) leur délai d'apparition en jours (B). Pour calculer l'index, on divise les nombres correspondants à ces deux critères et on multiplie le quotient par 100.

Etant donné les variations d'activité des composés cancérigènes en fonction du test utilisé, nous ajouterons à ce tableau un autre tableau emprunté à Fieser (125) et relatif à la période de latence nécessaire à l'apparition de sarcomes après injections sous-cutanées.

TABLEAU I

Tableau d'activité des composés cancérigènes (test cutané sur la Souris)

Composés	Souris vivantes à l'apparition de la 1re tumeur	Nombre de tumeurs	% de tumeurs (A)	Délai d'apparition en jours	Index A B ×100
9.10. Diméthyl 1.2. benzanthracène	20	13	65	43	151
20. Méthylcholanthrène	18	8	100	99	101
3.4. Benzopyrène	9	7	78	109	72
Cholanthrène	49	28	57	112	51
	14	13	93	194	48
2. Méthyl 3.4. benzanthracène	16	12	75	155	48
10. Méthyl 1.2. benzanthracène	18	12	66,5	147	45
5.6. Diméthyl 1.2. benzanthracène	19	16	84	220	38
6. Isopropyl 1.2. benzanthracène	15	11	73,5	204	36
3.4.5.6. Dibenzocarbazol	19	9	47,5	143	33
3.4.8.9. Dibenzopyrène	17	10	59	205	29
5. Méthyl 1.2. benzanthracène	8	7	87,5	317	28
5. Ethyl 1.2. benzanthracène	9	7	77,5	285	27
1.2.5.6. Dibenzanthracène	65	41	63	239	26
3.4. Benzophénanthrène	18	12	67	387	17
1.2.5.6. Dibenzocarbazol	9	4	44,5	263	17
5.*n* Propyl 1.2. benzanthracène	20	6	30	192	16
3.4.5.6. Dibenzacridine	28	11	39,5	357	11
3' Méthyl 1.2.5.6. dibenzanthracène	25	7	28	325	9
1.2.5.6. Dibenzacridine	25	6	24	350	7

TABLEAU II

Classification sommaire des carbures cancérigènes d'après la période de latence nécessaire à l'apparition des sarcomes (Injections sous-cutanées ; Souris)

PÉRIODE DE LATENCE COURTE	PÉRIODE DE LATENCE MOYENNE	PÉRIODE DE LATENCE LONGUE
3.4. Benzopyrène.	1.2.5.6. Dibenzanthracène.	3.4. Benzophénanthrène.
20. Méthylcholanthrène.	9. Méthyl 1.2. benzanthracène.	6. Méthyl 1.2. benzanthracène.
5.10. Diméthyl 1.2. benzanthracène.	5. Méthyl 1.2. benzanthracène.	3. Méthoxy 1.2. benzanthracène.
9.10. Diméthyl 1.2. benzanthracène.	20. Ethylcholanthrène.	
10. Méthyl 1.2. benzanthracène.	2. Méthyl 3. 4. benzophénanthrène.	

RAPPORTS DE CONSTITUTION ENTRE LES DÉRIVÉS CANCÉRIGÈNES DE SYNTHÈSE ET DES MOLÉCULES PHYSIOLOGIQUES

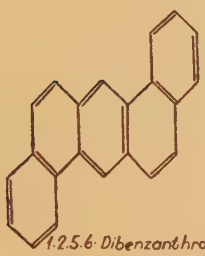
En ayant terminé avec l'énumération des principaux composés chimiques cancérigènes actuellement connus, nous remarquerons que l'activité cancérigène se retrouve dans les substances de structure assez différente et qu'elle est beaucoup moins liée qu'on ne l'avait pensé tout d'abord à un type particulier de configuration moléculaire.

Il est toutefois un fait très important à souligner relativement à cette configuration : certains composés cancérigènes parmi les plus actifs, en particulier le 1.2.5.6. dibenzanthracène, le 3.4. benzopyrène et les cholanthrènes, ont des rapports de constitution extrêmement étroits avec des substances existant normalement dans l'organisme et y jouant même un rôle de tout premier plan. Ces substances appartiennent au groupe des Stéroïdes : ce sont les Stérols proprement dits et en particulier le Cholestérol, les Acides biliaires, les Hormones sexuelles, les Hormones corticosurrénales (tableau III).

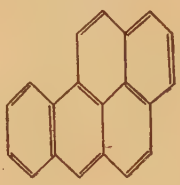
Tous ces composés sont des dérivés tétracycliques renfermant un cycle pentagonal accolé à un cycle phénanthrénique plus ou moins hydrogéné, squelette phénanthrénique que nous avons retrouvé dans de nombreux composés cancérigènes. On peut concevoir une filiation chimique simple entre de telles molécules et certains composés cancérigènes. Nous avons vu comment on avait ainsi pu synthétiser le méthylcholanthrène à partir des acides biliaires. Remarquons qu'une telle synthèse, qui comporte

Tableau III

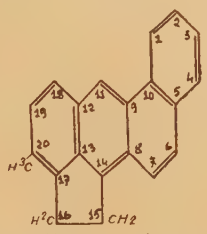
Carbures cancérigènes et substances du groupe des Stéroïdes



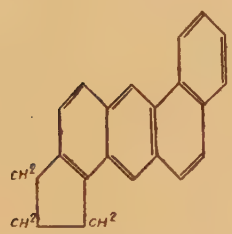
1.2.5.6-Dibenzanthracène



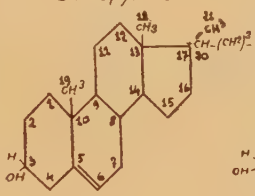
3.4-Benzopyrène



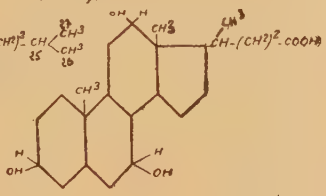
Méthylcholanthrène



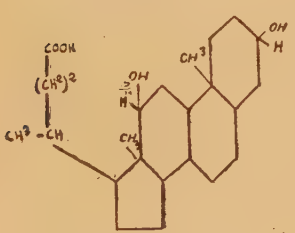
5.6-Cyclopentenoïd 2 Benzanthracène



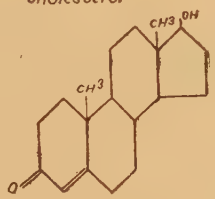
Cholestérol



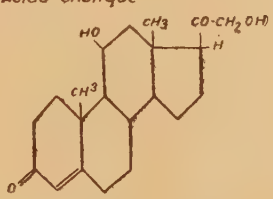
Acide cholique



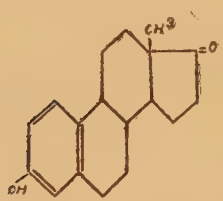
Acide désoxycholique



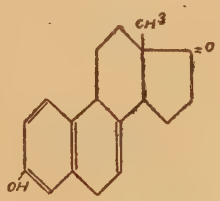
Testostérone



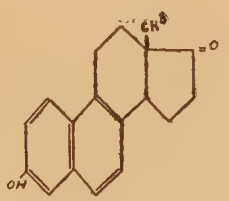
Costicostérone



Œstrone ou folliculine



Equiline



Equilénine

une cyclisation aux dépens de la chaîne latérale du cycle pentagonal du cholestérol ou des acides biliaires, ne serait plus possible à partir des hormones naturelles du groupe des stéroïdes qui ne possèdent plus cette chaîne latérale.

Ce que le chimiste réalise au laboratoire, pourquoi l'organisme, au sein duquel s'accomplissent les réactions de synthèse et de dégradation les plus complexes, ne pourrait-il pas le réaliser ? Si oui, et c'est là, comme nous l'avons déjà dit, l'hypothèse émise en 1933 par Cook et ses collaborateurs, il pourrait se former au sein de l'organisme même, dans des conditions biochimiques à préciser, des composés cancérigènes. L'apparition du cancer serait dès lors sous la dépendance de facteurs chimiques endogènes et on s'expliquerait ainsi le développement spontané des cancers d'organes profonds, cancers viscéraux par exemple, qu'il est difficile d'expliquer par l'intervention d'agents externes.

Cette hypothèse de Cook a été l'idée directrice de la plupart de nos recherches.

Quoi qu'il en soit, de très nombreux travaux ont été effectué avec les agents chimiques cancérigènes de synthèse, travaux portant, soit sur les divers facteurs influençant leur activité (voies d'introduction, espèces animales, solvant utilisé, substances adjuvantes, etc...) soit sur leur influence vis-à-vis des systèmes enzymatiques, soit sur leur métabolisme, domaine dans lequel il reste beaucoup à faire, soit sur leur mécanisme d'action.

L'exposé de toutes ces recherches dépasserait le cadre de notre travail.

Nous nous bornerons simplement à exposer brièvement deux des dernières théories du mécanisme d'action des substances douées d'une aussi curieuse propriété, théories qui n'ont guère eu l'occasion d'être analysées jusqu'ici :

LES THÉORIES CHIMIQUES DU MÉCANISME D'ACTION DES DÉRIVÉS CANCÉRIGÈNES

1° Théorie de la structure électronique

Cette théorie a été émise par Schmidt (343) en 1941. D'après elle, il y aurait une liaison possible entre la structure électronique et le pouvoir cancérigène.

Mme Pullman (294) a entrepris un examen systématique des hydrocarbures aromatiques cancérigènes pour déterminer la nature de cette relation. Elle a utilisé la méthode des diagrammes moléculaires récemment créée en France par elle-même, en collaboration avec Daudel (88), méthode qui permet, par une application des principes de la mécanique ondulatoire, de déterminer la répartition d'un nuage électronique en chaque point d'une molécule aromatique. On obtient ainsi une image beaucoup plus précise de la structure intime d'une molécule que celle

donnée par les formules développées de la chimie organique, et susceptible de fournir une explication plus profonde du comportement des corps.

En possession de cette méthode, Mme PULLMAN a montré que l'hypothèse de SCHMIDT, considérant les sommets méso comme points actifs des carbures cancérigènes, était à écarter ; en effet :

a) Des corps comme l'anthracène, le naphtalène, le benzanthracène, qui possèdent justement de grosses charges en méso, ne sont pas cancérigènes ;

b) Au contraire, des corps qui ne possèdent pas de points méso aussi chargés, comme par exemple le benzophénanthrène, sont actifs ;

c) Tandis que l'anthracène lui-même n'est pas cancérigène, l'anthracène diméthylé en méso (ayant donc ces sommets masqués) l'est légèrement ;

d) On ne peut pas, dans cette hypothèse, expliquer l'activité du dibenzofluorène par exemple ;

e) La différence caractéristique entre les 5.6. benzacridines méthylées, en général inactives, et les 7.8. benzacridines méthylées, en général actives, reste inexplicable ;

f) Dans une même famille de corps, tels que les différents benzanthracènes mono- ou polysubstitués, on ne parvient pas à obtenir une relation homogène entre le pouvoir cancérigène et la charge des sommets méso-anthracéniques.

En revanche, Mme PULLMAN souligne l'existence, dans tous les corps contenant le noyau phénanthrénique (présent dans la presque totalité des hydrocarbures polycycliques cancérigènes), d'une zone très fortement chargée, située sur la région méso du phénanthrène et composée d'une liaison très chargée ayant à ses deux extrémités des sommets également très chargés. Cette liaison qui est une liaison aromatique activée fut appelée primitivement par Mme PULLMAN (295) région méso-phénanthrénique. Comme elle peut aussi apparaître sous l'influence de divers facteurs (substituants), en d'autres points de la molécule, elle l'a appelée région K.

Mme PULLMAN a déterminé, pour un grand nombre de substances appartenant aux groupes du 1.2. benzanthracène, des 5.6. et 7.8. benzacridines et du 3.4. benzophénanthrène, la charge de cette région K et comparé la variation de cette charge à la variation de l'activité de ces substances.

Les résultats obtenus montrent nettement « qu'une liaison intime doit exister entre la région K et l'activité biochimique des substances examinées. On est obligatoirement conduit à admettre que la région K intervient réellement d'une manière directe ou indirecte dans le processus de

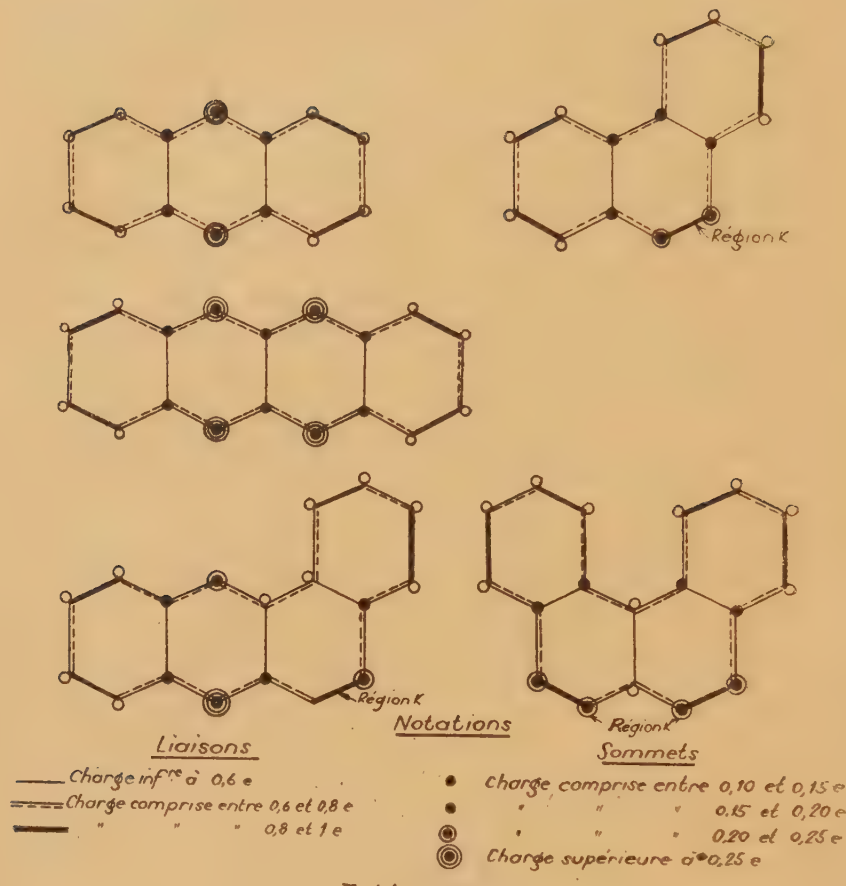


Tableau IV

la cancérisation. On peut imaginer qu'elle est le siège de multiples phénomènes d'interaction électronique entre l'hydrocarbure et une molécule de la cellule, interaction pouvant prendre les diverses formes d'action chimique (catalyse, addition, rupture, etc...). On peut admettre ainsi qu'elle est le siège de perturbations énergétiques pouvant jouer un rôle dans l'origine du cancer. Nous ne croyons pas, ajoute cependant Mme PULLMAN, que l'existence de cette zone puisse en elle-même suffire à élucider le processus intime de la cancérisation qui ne peut être fonction d'un seul facteur. »

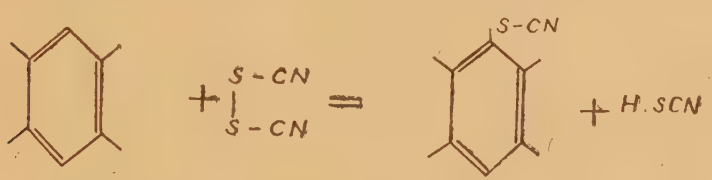
Cette hypothèse permet également d'expliquer la diminution d'activité subie par des substances hautement cancérigènes, lorsqu'on leur associe des corps d'activité cancérigène faible ou nulle dont la structure est suffisamment voisine de la leur, comme l'ont montré LACASSAGNE,

Buu-Hoï et leurs collaborateurs (218) en expérimentant, par exemple, avec les couples méthylcholanthrène + 1.2.5.6 dibenzofluorène ou 1.2.5.6 dibenzanthracène + 1.2.5.6 dibenzacridine ou encore méthylcholanthrène + certains dérivés diméthylés ou triméthylés de la 5.6. benzacridine. En effet, « on imagine aisément qu'un corps possédant une région K voisine du seuil, introduit dans l'organisme en même temps qu'une substance à région K forte, puisse, en entrant lui-même en interaction avec la molécule à cancériser, empêcher l'action du cancérigène. Les lois de la probabilité suffiraient donc à expliquer le phénomène d'inhibition. La région K responsable de la cancérisation jouerait ainsi un rôle essentiel dans l'action des antagonistes. Une confirmation intéressante de ce point de vue se trouve dans le fait que les corps qui possèdent une région K très en-dessous du seuil ne semblent pas avoir d'action antagoniste. On peut donc prévoir l'existence d'un seuil d'inhibition, probablement très voisin du seuil de cancérisation ».

Récemment, Pullman (296) a étendu la théorie électronique aux composés cancérigènes du groupe des azoïques où la charge serait concentrée dans la région médiane — N = N — (région K').

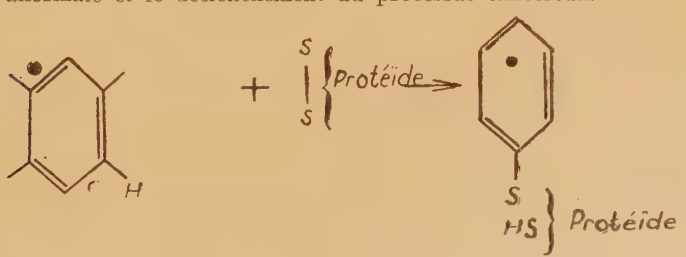
2° Théorie du rôle des groupes sulfhydryles

Cette théorie a été émise par Wood et Fieser (417). Ces auteurs ont montré que le 3.4. benzopyrène et le méthylcholanthrène sont capables de dissocier la molécule du rhodane, selon la réaction :



avec libération d'un groupement SH libre.

A partir de cette constatation, ils ont formulé l'hypothèse que le mécanisme d'action primaire des carbures cancérigènes résiderait dans une combinaison d'addition sur les liaisons disulfure —S—S— des protéïdes, avec apparition de groupes — S. H., d'où rupture de l'équilibre —S—S— ... — SH au profit des groupes réduits, entraînant la glycolyse anormale et le déclenchement du processus cancéreux.

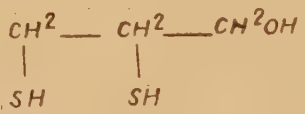


A l'appui de cette hypothèse, nous rappellerons que

1° Hammet (157) a signalé une prolifération cellulaire par badigeonnages au benzylmercaptan $C_6H_5CH_2SH$.

2° Crabtree (83) a montré que l'application locale de bromobenzène, dont on sait qu'il abaisse le taux de glutathion réduit en même temps qu'il est détoxiqué sous forme de mercapturate, inhibait l'action cancérigène cutanée du 3.4. benzopyrène.

3° Tout récemment, l'Ecole américaine, avec Gilman et Philips (143), Rhoads (307), Goodmann, Wintrobe et leurs collaborateurs (148), Jacobson, Spurr et leurs collaborateurs (181), Karnofsky, Burchenal et leurs collaborateurs (190), a souligné le rôle anticancérigène, dans certaines variétés de cancers, de substances à action vésicante dont le type est la β. β' β" trichloroéthylamine, homologue azoté de l'ypérite. Or, d'après les travaux des biochimistes et en particulier ceux de Peters et ses collaborateurs (286) en Angleterre, de Bacq (12) en Belgique, de Binet et Weller (32) en France, de Waters et Chester Stock (402) en Amérique, il semble que les vésicants agissent précisément en bloquant les groupes — S. H. des protéïdes; à tel point que, pour combattre l'action de ces substances, Peters et ses collaborateurs ont mis au point le 2.3. dimercaptopropanol.



British-anti-lewisite, appelé par abréviation B.A.L.

Il nous a été donné personnellement, dès 1933, dans des travaux militaires ayant donné lieu à des rapports secrets et par suite non publiés, de montrer qu'en effet les substances à groupe — S.H. : glutathion, cystéine et thioglycolate de sodium exerçaient, vis-à-vis d'agressifs vésicants tels que l'ypérite, la lewisite et la β. β' β" trichloroéthylamine, une nette action détoxicante. Par ailleurs, nous avons en cours, à l'Institut du Cancer, en liaison avec les services cliniques du Professeur Agrégé R. Huguenin, une expérimentation systématique sur l'activité anticancéreuse de l'ypérite et de la β. β' β" trichloroéthylamine qui nous a déjà permis de confirmer en gros les conclusions favorables des auteurs américains.

D'autres faits vont cependant à l'encontre de l'hypothèse de Fieser et Wood. C'est ainsi que Kensler et ses collaborateurs (196), Cohen et

ses collaborateurs (73) et POTTER (291) ont observé que les produits de désintégration d'un agent chimique cancérigène azoté, le *p*-diméthylamino-azobenzène, inhibaient certains systèmes enzymatiques et en particulier les transaminases, les carboxylases, l'uréase et la succinodéshydrogénase dont on sait (27) qu'ils sont très sensibles à l'influence des groupes — SH. qui interviennent dans leur activité. Les auteurs présentent d'ailleurs, dans leurs publications, un certain nombre d'arguments, d'après lesquels l'inhibition causée par les produits de désintégration de l'azoïque dans l'organisme serait due à leur combinaison avec les groupes sulfhydrylés des protéïdes enzymatiques.

Nous verrons, dans la seconde partie de ce travail, quelle contribution nous avons personnellement apportée à ce problème du rôle des substances sulfhydrylées dans la biochimie du cancer.

DEUXIEME PARTIE

RECHERCHES SUR LA CANCÉRISATION PAR LE 3.4. BENZOPYRÈNE

Cette deuxième partie, qui relate les résultats personnels que nous avons obtenus dans l'étude expérimentale de la cancérisation par le benzopyrène, comporte trois chapitres :

Une premier chapitre consacré à l'étude de la synthèse de carbure, étude qui nous a permis d'apporter certains perfectionnements aux méthodes publiées par les auteurs anglais ou américains;

Un deuxième chapitre, dans lequel sera étudiée l'activité cancérigène du carbure, en fonction des espèces animales choisies, des voies d'introduction et, enfin, des doses utilisées;

Un troisième chapitre, dans lequel nous apporterons une contribution personnelle à l'étude du mécanisme de l'action cancérigène du 3.4. benzopyrène.

CHAPITRE PREMIER

SYNTHÈSE DU 3.4. BENZOPYRÈNE

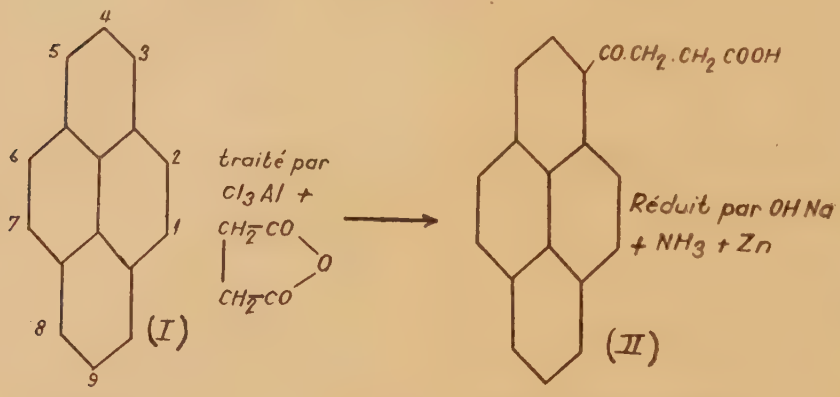
Nous avons réalisé cette synthèse sous la direction de notre Maître Sannié. Nous n'apporterons pas ici une méthode originale, puisque le schéma général de la synthèse a été indiqué d'abord par Cook et Hewett (77), puis par Winterstein, Vetter et Schön (415), et enfin par Fieser et Fieser (126).

Mais ces divers auteurs sont fort avares de détails et il nous paraît utile de préciser sur certains points la technique que nous avons suivie et qui comporte certains perfectionnements par rapport aux méthodes des auteurs ci-dessus.

Nous rappellerons tout d'abord le schéma général de la méthode :

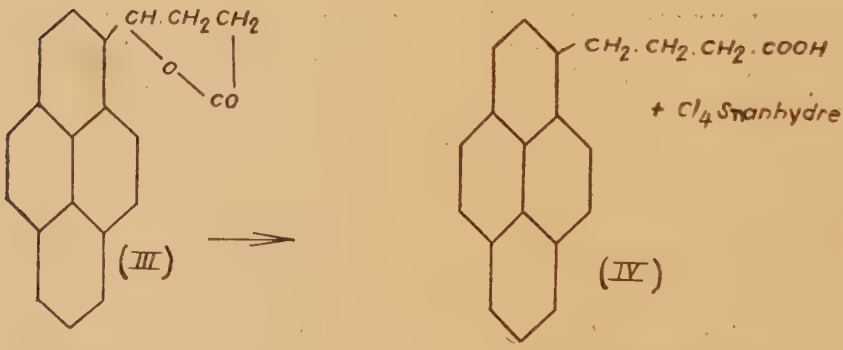
On part du pyrène (1) que l'on traite par l'anhydride succinique en

présence de trichlorure d'aluminium suivant la réaction générale de Friedel et Crafts, ce qui donne l'acide β 3 pyrénoylpropionique (II).



Pyrène — Ac. β -pyrénoyl-propionique

que l'on réduit par la poudre de zinc en milieu sodique et ammoniacal ce qui donne l'acide γ 3. pyrénylbutyrique (IV) en passant par le stade lactone de l'acide γ 3 pyrényl γ hydroxybutyrique (III).

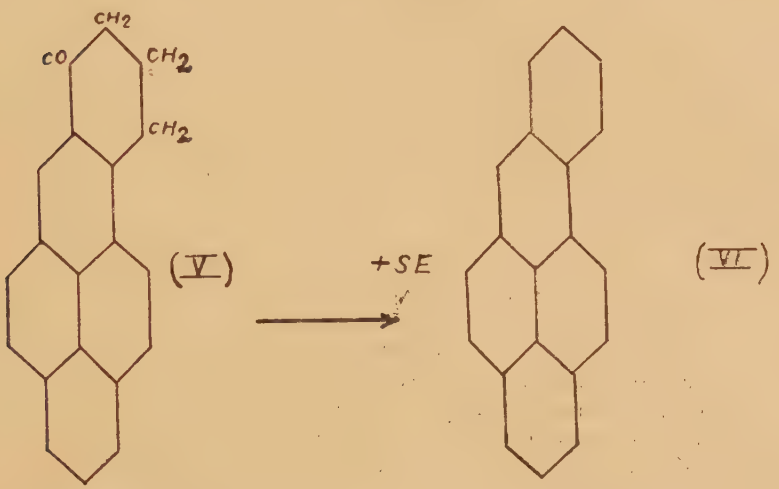


Lactone de l'acide γ 3. pyrényl-γ hydroxybutyrique — Ac. γ 3. pyrénylbutyrique

On traite ensuite l'acide obtenu par le chlorure de thionyle, ce qui donne le chlorure d'acide que l'on cyclise par chauffage avec du chlorure stannique anhydre. On obtient ainsi le 4' céto 1'2'3'4 tétrahydro 3.4. benzopyrène (V) qu'il suffit ensuite de déshydrogéner par pyrolyse avec de la poudre de sélénium pour le transformer en 3.4. benzopyrène (VI).

Voici maintenant les points sur lesquels il nous a été possible d'introduire des modifications avantageuses :

Dans la première étape de la synthèse, le produit obtenu dans la condensation avec l'anhydride succinique doit être décomposé, d'après Cook, par l'acide chlorhydrique à 10 % en opérant dans la glace. Mais



1'-céto. 1'2'3'4' tétrahydrobenzopyrène — 3.4. Benzopyrène

l'entraînement ultérieur à la vapeur d'eau en présence d'acide chlorhydrique provoque des pertes par suite de la fragilité de tous les dérivés à chaîne latérale du pyrène. Nous avons évité cet inconvénient en utilisant, à la place de l'acide, la soude à 10 % utilisée également à 0°. Naturellement, il se précipite de l'alumine, mais on peut facilement l'éliminer par centrifugation; nous avons utilisé pour cela une petite ultracentrifugeuse Sharples de laboratoire.

Dans la réduction par la poudre de zinc en milieu sodique et ammoniacal, il se forme comme stade intermédiaire de l'acide γ 3 pyrényl γ hydroxybutyrique. Une portion de cet acide n'est pas transformée en acide γ 3 pyrénylbutyrique et il faut, par suite, dans la technique de Cook, séparer l'acide hydroxylé de l'acide réduit en portant à l'ébullition dans du xylène, ou mieux, ainsi que l'a indiqué Winterstein, en traitant par l'acide chlorhydrique à l'ébullition. On sépare la lactone et on traite de nouveau celle-ci. Pour transformer complètement tout l'acide cétonique en acide réduit, il faut répéter à plusieurs reprises cette opération.

Nous avons réussi à éviter ces multiples réductions de la lactone en catalysant l'hydrogénation par du bichlorure de mercure ou du sulfate

de cuivre. Il suffit d'ajouter 1 gramme de sulfate de cuivre au milieu où se fait la réduction pour obtenir en une, deux ou trois opérations, au plus, la réduction totale de l'acide cétonique.

Au stade de la cyclisation, il faut noter l'importance d'une purification soignée de l'acide γ 3 pyrénylbutyrique. Il faut en particulier avoir soin de chasser par le vide toute trace de chlorure de thionyle.

Nous avons, par cette méthode, obtenu un benzopyrène qui, après cristallisation dans le dioxane, se présente en belles aiguilles jaune verdâtre fondant à 176° 5-177° 5. L'étude de ses courbes d'absorption dans l'ultraviolet par Sannié et Poremski (331) a montré qu'il n'était pas absolument pur, souillé en particulier d'une petite quantité de 4' céto 1'.2'.3'.4' tétrahydro 3.4 benzopyrène.

Pour le purifier, nous avons eu recours à la chromatographie sous pression dans une atmosphère de gaz inerte (azote), suivant la technique mise au point par Sannié (332) : le dispositif classique décrit par les auteurs qui ont mis au point la technique chromatographique, en particulier par Winterstein et ses collaborateurs (416), est constitué par un tube vertical, mesurant le plus souvent 20 à 30 cm. de hauteur et de 3 à 8 cm. de diamètre, fermé vers le bas par un dispositif filtrant et monté sur une fiole à vide. On introduit l'adsorbant en suspension dans le solvant choisi, par le haut du tube, en faisant par le bas un vide plus ou moins poussé. Puis, on fait passer sur la colonne d'adsorbant ainsi obtenu la solution des substances à séparer, en maintenant régulièrement le vide.

Ce procédé présente un inconvénient assez grave lorsque l'on utilise des solvants très volatils comme l'éther de pétrole ou le sulfure de carbone et une plaque filtrante à grains fins.

Le vide nécessaire pour faire passer le liquide à travers la colonne doit être assez poussé. Le solvant se vaporise alors en partie à l'intérieur de la colonne d'adsorbant, formant des bulles qui détruisent son homogénéité. D'autre part, le solvant s'évapore à la sortie de la plaque filtrante, les substances en solution se déposent à ce niveau et peuvent obturer les pores de la plaque. Il arrive même parfois, avec le benzène, que ce solvant cristallise dans le bas de l'appareil, sur la face inférieure de la plaque, empêchant ainsi son fonctionnement. On peut remédier, au moins en partie, à cet inconvénient, en prenant une plaque à pores plus gros, mais on court alors le risque de n'avoir plus une homogénéité suffisante dans la colonne d'adsorbant, ce qu'il faut soigneusement éviter.

Pour éviter tous ces inconvénients, nous avons opéré, non plus sous vide, mais sous pression, en utilisant le dispositif de Sannié (332).

Avec ce dispositif et des plaques filtrantes en verre d'Iéna de porosité convenable, on peut, sans perdre de solvants volatils et avec une pression très faible n'atteignant qu'exceptionnellement 40 cm. de mer-

cure, obtenir rapidement des chromatogrammes parfaitement réguliers.

L'adsorbant utilisé a été de l'alumine « activée » commerciale (Prolabo) que nous avons suractivée de la manière suivante : le produit est réduit en poudre fine et tamisé à travers un tamis 200. La poudre brute est mise à macérer dans un excès d'acide chlorhydrique concentré que l'on chauffe doucement jusqu'à ce que les soubresauts empêchent de continuer.

Le chauffage, qui ne pourrait être continué qu'avec une agitation difficile à réaliser par suite de la consistance de la pâte d'alumine, est alors interrompu et l'on abandonne le mélange 24 ou 48 heures, en agitant de temps en temps et, au besoin, en chauffant de nouveau.

La masse acide décolorée est introduite dans un récipient assez grand et lavée à grande eau, en agitant énergiquement à intervalles réguliers, de telle sorte que la poudre la plus fine soit mise en suspension et chassée par le courant d'eau. En continuant ainsi jusqu'à ce que le liquide s'éclaircisse plus ou moins vite, par exemple en quelques minutes, on peut, avec un peu d'habitude, obtenir des poudres de finesses différentes.

Les lavages sont continués jusqu'à ce que tout l'acide ait à peu près disparu; la pâte est séchée, puis calcinée à 400° pendant deux heures et demie. On obtient ainsi une poudre à peine teintée, ne colmatant pas les filtres, dont le pouvoir adsorbant dépend de la finesse des grains, mais est, en tout cas, au moins comparable à celui de « l'alumine activée d'après Brockmann » (Merck) et est beaucoup moins coûteuse.

La partie la plus ennuyeuse est la pulvérisation, qui doit être suffisante pour que tout passe au tamis 200, mais qui ne doit pas être trop poussée pour éviter un excès de poudre très fine et de trop grandes pertes. On peut, si l'on désire mieux standardiser les préparations d'alumine, conserver seulement ce qui passe entre les tamis 200 et 300.

Avec une telle alumine, nous avons procédé à la chromatographie de notre benzopyrène déjà purifié chimiquement; nous l'avons dissous dans le benzène à une concentration voisine de la saturation et, après chromatographie avec révélation également par du benzène, nous avons obtenu un benzopyrène de P. F. 179°. Les impuretés restent fixées à la partie supérieure de la colonne d'alumine.

CHAPITRE II

I. — ESSAIS DE CANCÉRISATION SUR DIVERSES ESPÈCES ANIMALES

Dans ces recherches, nous avons utilisé cinq techniques :

1° Badigeonnages répétés de la peau

A) *Expériences sur la Souris*

Vingt Souris ont été badigeonnées au niveau de la nuque avec une solution à 1 % du carbure dans le benzène, deux fois par semaine. Les badigeonnages ont été arrêtés après quatre mois et demi, les animaux ayant reçu en tout 40 applications.

Neuf animaux sont morts avant la cessation des badigeonnages et, sur les 9, 2 présentaient des épithéliomas (figure 1), l'un apparu après six semaines chez une Souris morte au bout de deux mois ; l'autre apparu chez une Souris morte après trois mois.

Parmi 11 animaux morts après l'arrêt des badigeonnages, 10 ont présenté des épithéliomas et 1 un papillome.

En résumé, sur 13 animaux qui ont vécu suffisamment longtemps, 12 ont présenté des cancers.

Les faits observés sont en somme très voisins de ceux que l'on constate après applications de goudron : assez forte mortalité initiale, apparition précoce de tumeurs chez certains animaux particulièrement sensibles à l'action cancérigène du produit, puis développement du cancer au bout d'un certain temps, même après cessation des badigeonnages. Dans l'ensemble, l'apparition des tumeurs est nettement plus précoce qu'avec l'emploi du goudron.

Il faut noter, cependant, certaines différences, lorsque l'on suit l'évolution des lésions, entre le goudron et le benzopyrène : le goudron est beaucoup plus irritant et les phénomènes cutanés locaux sont moins marqués avec le benzopyrène.

B) *Expériences sur le Rat*

La technique employée a été la même que pour la Souris. Contrairement à ce que l'on observe avec ce dernier animal et bien que les badigeonnages aient été continués sans arrêt pendant plus de dix mois, aucun animal n'était encore porteur de tumeur au bout de ce temps, alors que 9 sur 10 des animaux mis en expérience étaient encore vivants.

Or, les badigeonnages avaient déjà montré que la peau du Rat, quoique beaucoup moins sensible au goudron que celle de la Souris, n'est cependant pas réfractaire à son action.

Nous avons donc continué les expériences beaucoup plus longtemps qu'avec les Souris et, entre le douzième et le dix-huitième mois, sont apparues les premières modifications cutanées, des proliférations papillomateuses qui subirent, vers le vingtième mois, une transformation épithéliomateuse.

C) *Expériences sur le Cobaye*

La technique a consisté en un badigeonnage bi-hebdomadaire de la nuque avec une solution benzénique de benzopyrène à 1 % sans interruption pendant dix mois. Huit animaux ont été mis en expérience; ils ont présenté seulement des hyperplasies au niveau des follicules pileux ou des réactions bénignes du type papillome.

Cette sorte d'immunité du tissu cutané du Cobaye a été signalée également par divers auteurs et en particulier par Shear (350). Récemment, Chevallier, Denoix et Manuel (68) l'attribuent à une transformation plus rapide de la molécule cancérigène au contact de la graisse de Cobaye, ce qui provoque une accélération de l'élimination.

D) *Expériences sur la Poule*

La technique a consisté en badigeonnages bi-hebdomadaires sur la bajoue et le bréchet d'une solution benzénique du carbure à la concentration de 1 %.

Chez les 5 animaux mis en expérience, aucune tumeur n'apparut même après deux ans, sauf dans un cas où l'animal est mort en présentant, au point d'application, un épithélioma spino-cellulaire qui n'a pu être greffé.

E) *Expériences sur le Lapin*

Nous avons opéré sur un lot de 10 Lapins âgés de cinq à six mois, dont nous avons badigeonné deux fois par semaine la face interne d'une oreille avec une solution benzénique à 1 % de benzopyrène.

Chez quelques animaux il apparaît bien, au niveau de la région badigeonnée, un nodule tumoral gros comme une noisette qui se présente macroscopiquement comme un épithélioma spino-cellulaire, mais, malgré la persistance des badigeonnages, ces tumeurs disparaissent ensuite.

C'est au bout d'un an seulement que 6 Lapins survivants sur 10 commencèrent à présenter des proliférations malignes qui étaient des épithéliomas malpighiens à évolution lente et ne donnant pas de métastases.

Chez le Lapin, le benzopyrène permet donc d'obtenir des épithéliomas cutanés, mais ces tumeurs apparaissent plus tardivement qu'avec le goudron. Ces résultats tendraient à prouver que le goudron renferme d'au-

tres substances cancérigènes que le 3.4 benzopyrène ou qu'il contient des substances irritantes favorisant l'action des composés cancérigènes.

2° Injections sous-cutanées ou intramusculaires

A) *Expériences sur la Souris*

Nous avons opéré sur deux lots de 10 Souris.

Dans le lot 1, chaque animal a reçu 8 injections de 0 cm³ 5 d'une solution de benzopyrène à 1 p. 1.000 dans l'huile d'olive neutralisée (quantité totale de 3.4 benzopyrène injectée = 0 gr. 004), une semaine d'intervalle étant laissée entre chaque injection.

Dans le lot 2, chaque animal a reçu 8 injections dans les mêmes conditions, mais la solution de benzopyrène injectée était dix fois moins forte (quantité totale de 3.4. benzopyrène injectée = 0 gr. 0004).

Les résultats obtenus ont été les suivants :

Avec la solution huileuse à 1 p. 1.000, tous les animaux survivants après quatre mois et demi ont fait des sarcomes sous-cutanés au point d'injection ou dans les régions où a pu fuser la solution huileuse.

Chez ceux injectés avec la solution à 1 p. 10.000, le pourcentage de réussite n'a pas été total : seulement 60 % des animaux ont fait des sarcomes.

Pour éviter les inconvénients de l'emploi d'un solvant lipidique, nous avons cherché à obtenir une solution colloïdale de 3.4. benzopyrène. Nous l'avons préparée en dissolvant dans une solution isotonique de chlorure de sodium 5 grammes pour 1.000 de gélatine, ajoutant à ce soluté une solution de 3.4. benzopyrène à 2,5 p. 1.000 dans l'acétone en quantité convenable et chassant ensuite l'acétone au bain-marie. La gélatine joue ici le rôle de colloïde protecteur et permet d'avoir une suspension stable.

Avec cette solution colloïdale utilisée, comme la solution huileuse, en injections sous-cutanées et à des concentrations de 1 p. 1.000 et de 1 p. 10.000, nous n'avons obtenu, chez 20 animaux expérimentés, aucune tumeur.

B) *Expériences sur le Rat*

Nous avons opéré sur deux lots de 5 Rats.

Dans le lot 1, chaque animal a reçu 8 injections hebdomadaires d'un cm³ d'une solution à 1 p. 1.000 de benzopyrène dans l'huile d'olive neutralisée. (Quantité totale de benzopyrène injectée : 0 gr. 008.)

Un des animaux succomba onze jours après le début de l'expérience; un deuxième, après quatre mois et demi. Chez ce dernier, il y avait, au niveau de la région injectée, un granulome de résorption (huilome avec début de sarcome). Les trois Rats restants présentèrent, au cinquième mois, des tumeurs sous-cutanées d'apparence très prolifération qui, histologiquement, s'avérèrent des sarcomes.

Dans le lot 2, chaque animal a reçu 8 injections hebdomadaires de 1 cm³ d'une solution à 1 p. 10.000 de benzopyrène dans l'huile d'Olive neutralisée. (Quantité totale de benzopyrène injectée = 0,0008.)

Quatre Rats ont succombé en cinq mois et demi, six mois et demi, sept mois et sept mois et demi, avec de grosses tumeurs développées au point d'injection (sarcomes).

C) *Expériences sur la Poule*

Cinq Poules ont reçu, une fois par semaine pendant huit semaines, une injection de 1 cm³ d'une solution de benzopyrène à 1 p. 1.000 dans l'huile d'Olive neutralisée.

Ces animaux n'ont présenté aucune tumeur.

3° Insertion d'un cristal de benzopyrène sous la peau

Cette technique de l'insertion sous forme solide a été utilisée également par Shear (352) sous forme de solution solide de carbure cancérigène dans le cholestérol (1, 0,1; 0,01 0,001 pour 100) ou d'agglutinat dans le glycérol.

A) *Expériences sur la Souris*

Vingt-deux animaux ont été traités. La plupart ont fait des sarcomes au voisinage du cristal.

B) *Expériences sur le Rat*

Sur 12 animaux expérimentés, 7 sont morts dans les six premiers mois sans tumeur. Deux ont succombé à de volumineux sarcomes, l'un huit mois, l'autre dix mois et demi après l'opération.

Les trois animaux restants ont servi à l'étude des stades initiaux du développement tumoral; les nodules qui s'étaient formés tout autour du cristal inséré furent excisés au début du septième mois; on a constaté deux sarcomes au début.

Cette production de sarcome au contact de cristaux de benzopyrène, insérés sous la peau, démontre l'action cancérigène du carbure même à des doses très faibles. La quantité de substance active dans ces cas doit être très minime, car le benzopyrène n'est dissous que par les lipides des humeurs et la diffusion du produit dissous dans les lipides tissulaires est rapidement arrêtée par la coque conjonctive qui se forme autour des cristaux.

4° Injections intratrachéales

Cette technique n'a été appliquée qu'au Rat. Elle consiste dans la mise à nu de la trachée juste au-dessous du larynx. On injecte, en une seule fois, 0 cm³ 2 à 0 cm³ 3 de solution de benzopyrène à 1 p. 1.000

dans l'huile d'Olive neutralisée (quantité totale injectée = 0 mgr. 2 à 0 mgr. 3).

Les animaux ont présenté des sarcomes péritrachéaux caractéristiques. La localisation de ces tumeurs nous a surpris, car nous espérions, par cette technique, faire pénétrer jusque dans les alvéoles pulmonaires le produit injecté et pensions pouvoir étudier ainsi son action sur les voies respiratoires. L'apparition de tumeurs au voisinage du point d'injection, derrière la trachée, est très probablement due à une petite blessure de la muqueuse trachéale par l'aiguille introduite dans la trachée et par le dépôt d'une quantité minime de la solution huileuse dans le tissu conjonctif lésé. Si l'on songe que, dans ces expériences, la quantité totale du produit injecté n'a pas dépassé 0,3 mgr. et que la plus grande partie a certainement été injectée dans la trachée, on conçoit que la quantité nécessaire pour déclencher la production d'une tumeur maligne chez l'animal sensible puisse être extraordinairement minime.

5° Injections ou insertions intraviscérales

A) *Expériences sur le Rat*

Nous avons obtenu des résultats négatifs avec des injections intra-hépatiques (5 Rats) et intra-rénales (5 Rats) de solution colloïdale à 1 p. 10.000 ou après injections de 0 cm^3 25 de solution huileuse également à 1 p. 10.000 dans le rein (5 Rats).

Par contre, nous avons eu des résultats positifs par insertion d'un cristal de benzopyrène dans le rein (5 Rats). Nous avons alors obtenu des épithéliomas malpighiens aux dépens de l'épithélium du bassinet.

Nous avons également injecté du benzopyrène dans le cerveau après trépanation du Rat (1 goutte de solution huileuse au millième). Une autre technique a consisté à inclure un petit cristal de carbure dans la substance cérébrale au contact des méninges.

Nous avons vu apparaître, dans nos séries d'expériences, un pourcentage important de tumeurs hypophysaires qui, jusqu'ici, s'étaient manifestées spontanément de façon très rare dans notre élevage.

Mais, ultérieurement, l'étude systématique des Rats non injectés avec des carbures cancérigènes, poursuivie au Laboratoire de Médecine expérimentale de l'Institut du Cancer, a montré que, contrairement à ce que l'on pensait, les tumeurs hypophysaires spontanées du Rat blanc sont loin d'être exceptionnelles. Si elles sont effectivement rares chez des animaux âgés de moins de vingt mois, leur fréquence s'accroît rapidement au delà de cet âge et peut atteindre, chez des animaux ayant dépassé deux ans, un taux de 25 %. Il est probable que, dans la série initiale d'expériences sur des Rats âgés, nous avons eu par hasard une

quantité importante d'animaux porteurs de tumeurs hypophysaires spontanées. On voit ainsi combien l'interprétation des essais sur l'animal est délicate dans les études de cancérologie expérimentale.

B) *Expériences sur la Poule*

L'injection intra-hépatique de 4 à 5 cm³ d'une solution colloïdale à 1 p. 10.000 n'a fait apparaître aucune tumeur (5 animaux).

6° Injections intraveineuses

Cette technique a été appliquée seulement à la Poule. Nous avons injecté à 5 animaux 4 à 5 cm³ de solution colloïdale à 1 p. 10.000.

Nous avons vu apparaître, au bout de quelques mois, des lésions variées : sarcomatose diffuse splénohépatique, sarcome de l'ovaire avec métastases, réticulose du foie et de la rate. Mais il n'est pas certain que ces modifications puissent être attribuées à la substance cancérigène elle-même.

7° Administration « per os »

A) *Expériences sur la Souris*

Nous avons opéré sur 20 Souris et nous leur avons administré, une fois par semaine, une solution à 1 p. 500 de benzopyrène dans du saindoux. Cette solution était étalée en couches minces sur du pain sec.

La mortalité a été assez considérable dans cette série puisque 16 animaux sont morts avant six mois. Nous n'avons pas obtenu de tumeurs. Un des animaux, mort au sixième mois, a bien présenté une hyperplasie de la muqueuse malpighienne du cardia, mais il ne s'agissait pas d'un cancer.

B) *Expériences sur le Rat*

Nous avons expérimenté sur 20 Rats, auxquels nous avons administré, dans les mêmes conditions qu'à la Souris, du benzopyrène en solution dans du saindoux à la concentration de 1 p. 500. Comme nous nous attendions à une résistance plus grande du Rat, nous avons effectué cette administration deux fois par semaine au lieu d'une.

Dans cette série, nous n'avons pas obtenu non plus de tumeurs.

De nombreux expérimentateurs et, en particulier, Reinhard et Candee (304), Nicod et Regamey (275), Valade (390), Prohaska, Brunschwig et Wilson (293), Magnus (250) et Buser (58) ont obtenu également des résultats négatifs en opérant soit avec du méthylcholanthrène, soit avec du 1.2.5.6. dibenzanthracène. D'autres auteurs et, en particulier, Waterman (398), Lorenz et Stewart (245), Collins, Gardner et Strong (74), Peacock et Kirby (282) obtinrent des résultats positifs, mais, comme le souligne Lacassagne (215), qui a analysé très à fond ces résultats, il n'est pas du tout certain que les carbures cancérigènes soient

ici les seuls facteurs en cause. Comme l'écrit le savant spécialiste français, « les tumeurs de l'estomac observées chez la Souris comme suite à l'administration d'hydrocarbures polycycliques, ne semblent en rien comparables aux formes habituelles du cancer gastrique chez l'Homme ».

II. — INFLUENCE DU SOLVANT SUR LE POUVOIR CANCÉRIGÈNE DU BENZOPYRÈNE

En dehors de l'étude des techniques de cancérisation par le 3.4. benzopyrène et de la sensibilité des différentes espèces animales à cet agent, nous avons fait quelques expériences sur l'influence exercée vis-à-vis de cette activité par le solvant utilisé.

Nous avons déjà souligné plus haut qu'une série de 10 Souris injectées avec une solution de 3.4. benzopyrène à 1 p. 10.000 dans l'huile d'Olive avait donné 4 sarcomes, alors qu'une autre série de 10 Souris, injectées avec une solution colloïdale à la même concentration, n'avait fourni aucune tumeur. Nous avons pensé alors que la réaction inflammatoire chronique provoquée par l'huile injectée pouvait favoriser la transformation sarcomateuse du tissu conjonctif.

Dans ce domaine, de nombreuses recherches ont été effectuées. Elles montrent, tout d'abord, qu'il faut en effet se méfier du pouvoir cancérigène de certains solvants du groupe des lipides. C'est ainsi que Barry et Cook (56), ayant injecté à titre de contrôle du lard rendu fluide à 37° à 20 Souris et à 10 Rats, n'obtinrent aucune tumeur chez les Souris mais en virent apparaître 2, respectivement au 385e et 462e jours, chez le Rat. Une étude sur ce sujet fut entreprise sur une vaste échelle par Burrows, Hieger et Kennaway (55), qui essayèrent différentes matières lipidiques (huile d'Olive, lard, etc.) en injections sous-cutanées et intra-péritonéales chez la Souris et le Rat. Sur 248 Souris, ils n'observèrent aucune tumeur; mais, sur 217 Rats, ils obtinrent 12 sarcomes, dont 5 à la suite d'injections sous-cutanées de lard uniquement. En 1939, Domagk (107), avec de la simple huile d'Olive injectée fréquemment à des Souris par voie intra-musculaire, a pu obtenir quelques sarcomes. D'après Rusch, Mueller et Kline (325), les huiles d'origine végétale favoriseraient la cancérisation, tandis que beaucoup de lipides d'origine animale la retarderaient.

Nous devons signaler que, dans nos expériences personnelles avec de l'huile d'Olive neutralisée et stérilisée, nous n'avons obtenu, sur plusieurs centaines de Souris traitées, qu'un seul cas de tumeur maligne.

A ces résultats, il faut ajouter ceux obtenus avec des solvants lipidiques chauffés. C'est ainsi que Beck (18) obtint 2 sarcomes sur 10 Souris auxquelles il avait injecté par voie sous-cutanée 0 cc. 50 d'huile de Coton chauffée à 340-360° pendant une heure. C'est ainsi, également, que Steiner, Steele et Koch (363) obtinrent, chez des Souris injectées par voie

sous-cutanée à trois reprises différentes et à quatre semaines d'intervalle avec 0 cc. 50 d'huile de Sésame chauffée à 350°, 3 sarcomes sur 31 animaux traités.

Pour se mettre à l'abri de ces causes d'erreurs, LEITER et SHEAR (235), et aussi SHIMKIN et ANDERVONT (340) ont recommandé l'emploi, comme solvant lipidique, d'un glycéride pur : le tricaprylide.

*
**

En dehors du pouvoir cancérigène propre de certains solvants, quelle peut être l'influence d'un solvant comme tel, sur l'activité cancérigène d'un agent chimique qu'il sert à dissoudre?

Signalons tout d'abord le travail de STOWELL et CRAMER (367), d'après lequel l'action cancérigène cutanée du méthylcholanthrène est plus rapide avec l'acétone qu'avec le benzène comme solvant. Plus récemment, SIMPSON et CRAMER (357) ont indiqué que, par dissolution dans la lanoline anhydre (concentrations de 0,3, 0,6 et 1 p. 100), le méthylcholanthrène perdait toute activité cancérigène cutanée. Enfin, MUELLER, MILLER et RUSCH (267) ont montré que, par dissolution dans des lipides autoxydables tels que l'acide linoléïque, le méthylcholanthrène et le 3.4. benzopyrène perdaient assez rapidement une grande partie de leur activité : 84 % en une semaine pour le méthylcholanthrène et 35 % dans le même temps pour le benzopyrène qui est transformé en 3.4. benzopyrène 4.8. quinone et 3.4. benzopyrène 5.10 quinone. C'est peut-être à la présence d'acides gras autoxydables que la graisse de Cobaye doit son pouvoir destructeur des molécules cancérigènes signalé par CHEVALLIER, DENOIX et MANUEL (155).

Dans le même ordre d'idée, nous rappellerons les expériences déjà anciennes de PEACOCK (283) qui, dès 1935, avait montré que l'activité du 1.2.5.6. dibenzanthracène chez le Poulet dépendait en partie du solvant. Les solutions dans le saindoux donnaient 16 tumeurs sur 31 animaux, celles dans la graisse de jaune d'œuf seulement trois sur douze, tandis que celles dans la graisse de Poulet ne donnaient plus aucune tumeur sur 10 Poulets injectés. En 1938, le même auteur, avec BECK (18), injecta par voie sous-cutanée, à des Souris, du 3.4. benzopyrène en poudre ou dissous par divers solvants (éther, huile d'Olive, mélange d'huile d'Olive et de paraffine, graisse de Souris). Ils ont suivi en même temps l'élimination de cette substance cancérigène par l'étude de la fluorescence en lumière ultra-violette dans la zone d'injection. Par cette méthode, ils ont pu constater que le benzopyrène, à l'état de poudre ou dissous dans l'éther et dans la graisse de Souris, est éliminé assez rapidement, en trois ou quatre mois, et détermine un pourcentage faible de tumeurs (5 sur 41 Souris survivant après quatre mois); au contraire, avec les autres solvants, l'élimination est retardée jusqu'à cinq ou six mois et le pourcentage des tumeurs est plus élevé (34 sur 46 Souris).

Personnellement, nous avons effectué des essais pour voir si, comme la graisse de Poulet ou de Souris, dans les expériences de PEACOCK et

Beck, la graisse de Rat utilisée comme solvant du 3.4. benzopyrène était susceptible d'inhiber son action cancérigène vis-à-vis de l'animal dont elle est extraite.

Nous avons opéré comparativement avec deux autres solvants lipidiques : l'huile d'Olive et le saindoux. Pour préparer la graisse de Rat, nous avons recueilli la graisse épiploïque et sous-cutanée de plusieurs Rats sains et nous l'avons lavée à l'eau pour la débarrasser du sang.

A partir des trois véhicules lipidiques, nous avons préparé, par dissolution au bain-marie à 37°, des solutions saturées en benzopyrène. Nous avons ainsi dissous, pour 100 cc. de saindoux ou de graisse de Rat, 2 gr. 50 de benzopyrène, et, pour 100 cc. d'huile d'Olive, 2 gr. 10.

Les solutions ont été stérilisées par chauffage à 100° pendant trois quarts d'heure.

Nous avons effectué deux séries d'expériences :

Dans une première série, 10 Rats ont été injectés avec la solution saturée de benzopyrène dans la graisse de Rat (lot I), 10 avec celle dans le saindoux (lot II), et 20 avec celle dans l'huile d'Olive (lot III).

Deux Rats dans le premier lot et un Rat dans chacun des deux autres sont morts d'une infection intercurrente, avant le moment où les tumeurs pouvaient apparaître.

Dans le lot I, 8 tumeurs apparurent chez 8 Rats avec des métastases ganglionnaires dans deux cas et tuèrent les animaux entre quatre mois et demi et sept mois après l'injection, la moyenne de survie étant de 5,75 mois.

Dans le lot II, nous avons observé 9 tumeurs sur 9 Rats, dont 2 avec métastases ganglionnaires; les animaux succombaient entre quatre mois et demi et dix mois et demi, en moyenne au bout de six mois et demi, après l'injection.

Dans le lot III, nous avons obtenu 18 tumeurs avec 4 cas de métastases ganglionnaires sur 19 Rats, après un temps de latence compris entre quatre mois et demi et dix mois, en moyenne de 6,4 mois.

Dans une deuxième série d'expériences, nous avons opéré avec des doses beaucoup moindres de benzopyrène.

Un premier lot de 10 Rats fut injecté avec 1 cm^3 de la solution de benzopyrène à 1 p. 1.000 dans la graisse de Rat. Deux animaux sont morts prématurément; sur les 8 Rats restants, 5 tumeurs apparurent, avec métastase dans un cas et évolution de cinq mois et demi à dix mois et demi, la durée moyenne de survie étant de huit mois.

Dans un deuxième lot de 15 Rats, chaque animal reçut 1 cm^3 d'une solution dans l'huile d'Olive au même taux. Sur 14 animaux ayant vécu assez longtemps, il y eut 11 tumeurs avec 1 cas de métastase et une évolution allant de cinq mois et demi à onze mois et demi, la mort survenant en moyenne en huit mois.

*
**

La conclusion que nous pouvons tirer de nos expériences sur l'influence des solvants est double :

a) Avec des solvants lipidiques de constitution chimique peu différente, tels que ceux que nous avons utilisés, les différences d'activité du 3.4. benzopyrène que nous avions observées, en comparant les solutions huileuses et les solutions colloïdales dans un soluté physiologique, disparaissent.

b) Nous n'avons pas retrouvé chez le Rat les faits observés chez le Poulet par Peacock et Beck, et confirmés d'ailleurs par Weil, Malherre et Dickens (405) ; l'emploi de graisse de Rat n'empêche pas l'apparition des tumeurs chez cet animal ; mais il ne favorise pas non plus la production des tumeurs par le benzopyrène, comme on aurait pu le penser *a priori*, en supposant une meilleure résorption de la graisse par l'animal.

III. — INFLUENCE DE LA DOSE UTILISÉE

L'ACTION DES FAIBLES DOSES

Certains de nos résultats, notamment les sarcomes développés après injections intra-trachéales chez le Rat ou ceux qui se développent après l'insertion dans le tissu sous-cutané d'un petit cristal de benzopyrène, nous permettent de penser que des doses extrêmement faibles devaient être suffisantes pour déclencher la production des tumeurs.

Si nous considérons, en effet, que le benzopyrène n'est pas soluble dans l'eau et que le petit cristal inséré dans les tissus est très rapidement entouré d'une capsule fibreuse, il est évident que la quantité résorbée ne peut être que minime.

Nous avons donc entrepris de rechercher systématiquement les quantités limites permettant de faire apparaître des tumeurs chez le Rat. Pour cela, nous avons injecté à des Rats du benzopyrène en solution huileuse à 1 p. 1.000 et à 1 p. 10.000, à des doses variables comportant comme limite extrême 0,05 mgr. En même temps, pour étudier l'influence de la dilution, nous avons employé des doses identiques dissoutes dans des quantités de solvants variables.

Les résultats que nous avons obtenus nous permettent de tirer les conclusions suivantes :

1° Nous n'avons pas atteint la dose limite absolue pour le benzopyrène employé en solution huileuse. Avec la plus petite dose utilisée (0,05 mgr.), nous avons encore obtenu des sarcomes, mais cette dose doit être assez proche de la dose limite, car le pourcentage de tumeurs observées est faible et le temps de latence d'un an et demi.

D'autres expérimentateurs ont abordé ce problème de la dose limite,

En 1939, Shear et Lorenz (353), puis, en 1940, Shear et Ilfeld (354) ont inclus sous la peau de la Souris de petites boulettes de cholestérol renfermant un taux variable, de 0,001 à 5 p. 100, d'un hydrocarbure cancérigène (1.2.5.6. dibenzanthracène, 3.4. benzopyrène, méthylcholanthrène). A la concentration de 1 p. 100, ces auteurs ont obtenu 2 tumeurs avec le 1.2.5.6. dibenzanthracène dont la quantité approximative était de 0,1 mgr. à 0,5 mgr. Nous sommes loin, ici, de la dose de 0,4 γ de 1.2.5.6. dibenzanthracène qui, dans un cas exceptionnel et resté unique, avait permis à Shear d'obtenir un sarcome chez la Souris.

A l'Institut du Radium de Paris, les recherches de Dobrowolskaia-Zavadskaia (101) ont mis en évidence que le 1.2.5.6. dibenzanthracène était encore actif à la dose de 2,5 γ : 2 sarcomes sur une cinquantaine de Souris. Le 1.2.5.6. dibenzanthracène étant moins actif que le 3.4. benzopyrène, il est permis de penser que le seuil d'activité de ce dernier corps se trouve au voisinage du γ, c'est-à-dire est du même ordre que celui exprimant l'activité des hormones du groupe des stéroïdes dont, comme nous l'avons vu, il se rapproche par sa structure chimique. C'est la conclusion que tirent Roussy, Guérin et Guérin (320), dans un travail sur l'activité comparée du 1.2.5.6 dibenzanthracène, du 3.4. benzopyrène et du méthylcholanthrène.

2° La dose employée est un facteur capital. A fortes doses, au-dessus de 2 mgr., la cancérisation survient presque fatalement dans le tissu conjonctif de l'animal sensible. Si l'on diminue la dose au-dessous de 1 mgr., la cancérisation devient de plus en plus rare et la période de latence augmente.

3° Le taux de dilution a également une grande influence. Une quantité de 3.4. benzopyrène, qui s'avère cancérigène lorsqu'elle est injectée en solution dans 0 cc. 5 d'huile, cesse de l'être lorsqu'elle est injectée dans 5 cc. du même solvant. Le seuil d'activité du 3.4. benzopyrène dépend donc, non seulement de la quantité absolue de substances injectées, mais encore de la concentration.

Conclusions de nos expériences de cancérisation sur l'animal

Nos expériences, soulignons-le tout d'abord, n'ont été effectuées que dans un travail d'équipe.

Du point de vue chimique, c'est notre Maître, le Professeur Sannié, qui en a assumé la direction, en y apportant, pour sa part, une très large collaboration. Du point de vue anatomo-pathologique et histologique, ce sont les travailleurs du Laboratoire de Médecine expérimentale de l'Institut du Cancer (Professeur Ch. Oberling, Docteurs M. et P. Guérin) qui, avec nous, ont abordé cette étude.

L'examen de l'ensemble de nos résultats appelle les conclusions suivantes :

1° L'activité cancérigène du 3.4. benzopyrène, comme celle du goudron, semble être plus ou moins élective pour certaines espèces et pour certains tissus. La Souris semble être l'animal de choix, car on obtient chez cet animal aussi bien des épithéliomas que des sarcomes, suivant qu'on applique le benzopyrène sur la peau ou qu'on l'injecte dans le tissu conjonctif. Chez le Rat et chez la Poule, la peau semble être réfractaire. De même, chez la Souris aussi bien que chez le Rat, l'épithélium du tube digestif, car, dans plusieurs de nos séries expérimentales, l'absorption *per os* du benzopyrène dissous dans du saindoux n'a donné aucun résultat.

Contrairement à ce que l'on a pu dire, la cancérisation est loin d'être obtenue en un point quelconque de l'organisme pourvu que l'on y applique un carbure cancérigène. Ce sont surtout l'épithélium malpighien et le tissu conjonctif qui se cancérisent. Les organes parenchymateux, et notamment les muqueuses cylindriques, se sont montrés, dans nos expériences, absolument réfractaires.

2° Du point de vue des doses actives, la dose limite suffisante pour produire des cancers chez l'animal sensible est extrêmement faible et peut tomber à quelques centièmes ou même à quelques millièmes de milligramme. Ce chiffre est, soulignons-le à nouveau, sensiblement du même ordre que les quantités d'hormones sexuelles et, en particulier, d'œstrone, nécessaires pour provoquer l'œstrus chez la Souris femelle castrée.

Etant donné la parenté de constitution chimique entre les hormones sexuelles d'une part et les carbures cancérigènes de l'autre, cette analogie entre leur action physiologique, spécifique sur certains tissus et à dose extrêmement faible, est du plus haut intérêt.

3° Signalons, enfin, que l'essai des produits intermédiaires purifiés obtenus dans la synthèse du 3.4. benzopyrène à partir du Pyrène : Acide β.3. pyrénoyl propionique ; acide γ 3. pyrénylbutyrique et 1' céto 1'2'3'4' tétrahydrobenzopyrène, suivant les techniques utilisées pour le 3.4. benzopyrène, a donné chez toutes les espèces animales expérimentées (Rat, Souris, Poule, Lapin), des résultats négatifs.

IV. — RECHERCHES SUR L'ACTION DU 3.4. BENZOPYRÈNE SUR LES TISSUS VÉGÉTAUX CULTIVÉS « IN VITRO »

Les tissus choisis ont été le tissu libérien et le cambium de Carotte (*Daucus Carotta*, Ombellifères) cultivées aseptiquement *in vitro* suivant les principes de Gautheret (139). Nous avons pris des carottes provenant d'une même variété de graines. Le prélèvement des tissus libérien et cambial a été réalisé avec toutes les précautions d'asepsie désirables et la culture a été effectuée sur le milieu de Knop solidifié par 2 % de gélose et additionné ou non de substances diverses. Le tissu libérien isolé du bois était, suivant les indications de Gautheret, couché sur le milieu gélosé coulé en tubes, la face morphologiquement externe reposant sur le milieu.

Le milieu fondamental est la solution nutritive de KNOP, dont la formule est la suivante :

Nitrate de Potassium	0 gr. 25
Nitrate de Calcium	1 gramme
Sulfate de Magnésium	0 gr. 25
Phosphate monopotassique	0 gr. 24
Chlorure ferrique	0 gr. 002
Eau distillée sur Pyrex	1.000 grammes

Les trois premiers sels doivent être dissous d'abord; on ajoute ensuite le phosphate monopotassique et on agite jusqu'à dissolution complète pour éviter la formation locale d'une solution concentrée de ce sel, ce qui produirait une précipitation de phosphates de calcium et de magnésium. On ajoute enfin le chlorure ferrique préalablement dissous. Il est indispensable, surtout lorsque les cultures doivent être longtemps poursuivies, d'utiliser de l'eau distillée dans un appareil en Pyrex ou, mieux, en quartz, l'eau distillée dans un appareil en cuivre étant légèrement toxique.

Nous avons employé cette solution diluée de moitié et additionnée de 2 % de glucose.

Comme nous n'avons pas pu nous procurer du papier d'étain, nous avons capuchonné les tubes de cultures avec des bandes de papier cristal.

Nous avons effectué quatre série de 12 cultures :

La première série a été cultivée sur liquide de KNOP dilué à 2 volumes, gélosé à 2 % et renfermant 2 % de glucose.

La deuxième série a été cultivée sur liquide de KNOP dilué à 2 volumes, gélosé à 2 %, renfermant 2 % de glucose et additionné de 0.005 % d'acide indol β acétique (hétéroauxine).

La troisième série a été cultivée sur liquide de KNOP dilué à 2 volumes, gélosé à 2 %, renfermant 2 % de glucose et injecté aseptiquement à l'aide d'une aiguille hypodermique avec 0 cm³ 10 d'huile d'Olive neutralisée et stérilisée.

Ces trois premières séries constituaient les cultures témoins.

Une quatrième série a été cultivée sur le même milieu que la série 3, mais au lieu d'injecter de l'huile d'Olive pure, nous avons injecté 0 cm³ 10 d'une solution de 3.4. benzopyrène dans l'huile d'Olive à 1 p. 10.000 (quantité de benzopyrène injectée : 1/10^e de milligr.).

Une cinquième série a été cultivée dans les mêmes conditions que la quatrième, mais la concentration de l'huile injectée en benzopyrène était deux fois moindre.

Les cultures ont été poursuivies pendant trois mois dans une étuve réglée à 18°.

Les résultats que nous avons obtenus sont tout à fait comparables à ceux de BUVAT (63) :

Avec les séries traitées, on observe, comparativement aux témoins et spécialement ceux de la troisième série, des excroissances beaucoup plus importantes. Il est à noter que ces excroissances ne sont pas sensiblement plus considérables dans la série 4 que dans la série 5.

L'examen microscopique a montré que la structure de ces excroissances est une structure ordinaire qui ne rappelle en rien celle des structures anarchiques des tumeurs humaines ou animales, et pas davantage d'ailleurs les structures des tumeurs à *Phytomonas tumefaciens*. On ne note pas, en particulier, de polyploïdie.

Des essais effectués avec d'autres carbures cancérigènes que le 3.4. benzopyrène et, en particulier, le 1.2.5.6. dibenzanthracène et le méthylcholanthrène, ont fourni des résultats comparables.

On peut donc conclure, comme l'a fait GARRIGUES (138) dans ses expériences sur la tige de Ricin avec le méthylcholanthrène et le 1.2.5.6. dibenzanthracène, et comme l'ont fait également KISSER et LINDENBERG (203), que les proliférations provoquées chez les Végétaux par le 3.4. benzopyrène et les autres carbures cancérigènes n'ont aucune malignité.

CHAPITRE III

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU MÉCANISME DE L'ACTION CANCERIGÈNE du 3.4. BENZOPYRÈNE

La Théorie de WOOD *et* FIESER

Nous avons exposé, dans la première partie de ce travail, la théorie émise par WOOD et FIESER (133), d'après laquelle l'activité des carbures cancérigènes serait due à une réaction d'addition sur les protéides tissulaires ou humoraux avec libération de groupes —SH. Nous avons apporté alors un certain nombre d'arguments à cette théorie.

Pour vérifier si l'hypothèse de WOOD et FIESER cadrait avec les faits, nous avons effectué trois groupes de recherches :

1° Détermination du taux de glutathion dans le sang des cancéreux.

2° Action du glutathion et des acides aminés qui le constituent sur les cellules en cultures.

3° Recherches d'une libération éventuelle de substances à groupe — SH par action de carbures cancérigènes *in vitro* sur les protéides du sang.

I. — Le Glutathion dans le sang des cancéreux

Antérieurement, un certain nombre d'auteurs ont effectué le dosage du glutathion du sang au cours des états cancéreux. La plupart, et en particulier HIRSCH (170 *bis*), WOODWARD (418), ACHARD, LÉVY et GUTTMANN (238), WILHEIM et STERN (406), trouvent une glutathionémie abaissée.

Nous avons effectué deux séries de dosages.

Dans une première série, nous avons utilisé la méthode de TUNICLIFFE, basée sur l'oxydation du glutathion réduit par l'iode N/100 en milieu trichloracétique à 10 %; mais nous avons opéré comme l'ont préconisé Mme RANDOUIN et FABRE (297) : lorsque, par affusion de la liqueur titrée d'iode, la réaction au nitroprussiate de sodium employé comme indicateur externe est devenue négative, on ajoute à la liqueur 2 cm³ de solution à 2 p. 1.000 d'amidon soluble et on continue à verser la solution centinormale d'iode jusqu'à obtention d'une teinte bleu violacé stable. On détermine ainsi deux chiffres (N et N') qu'il est bon de noter, leur écart pouvant, en lui-même, être intéressant. On traduit le résultat en glutathion réduit, en sachant que 1 cm³ d'iode N/100 correspond à 3 mgr. 07 du tripeptide.

Pour le prélèvement, le sang est recueilli chez les sujets à jeûn par ponction veineuse sans stase et s'écoule directement dans une éprouvette renfermant 20 cm³ de solution aqueuse à 20 % d'acide trichloracétique, de manière à avoir une stabilisation du rapport : glutathion réduit sur glutathion oxydé. Le volume de sang recueilli varie de 10 à 20 cm³. Après avoir agité, on filtre et on épuise le coagulum albumineux par l'acide trichloracétique à 10 % jusqu'à disparition de la réaction au nitro-prussiate de sodium en milieu ammoniacal. Cette réaction est effectuée en ajoutant à 1/4 de cm3 de liqueur trichloracétique, un cristal de nitroprussiate de sodium, puis, à la surface de la liqueur sans mélanger, IV à V gouttes d'ammoniaque. En présence de composés sulfhydrylés, il se fait un anneau rouge à la surface de séparation.

On note le volume total de liqueur trichloracétique ; ce volume pour 20 cm³ de sang était, en général, aux environs de 70 cm³. Comme le recommandent FABRE et Mme RANDOUIN, nous avons fait, pour chaque cas, un dosage témoin en présence d'empois d'amidon sur un volume de solution d'acide trichloracétique à 10 % égal au volume de l'extractum. Le chiffre obtenu est évidemment à défalquer de celui trouvé dans le dosage sur le sang.

En général, pour 100 cm³ d'acide trichloracétique à 10 % additionnés de 2 cm³ d'empois d'amidon à 2 %, il faut 0 cm³ 35 à 0 cm³ 37 d'iode N/100 pour obtenir le virage.

Nous avons ainsi examiné vingt-sept malades atteints de cancers divers, mais toujours à pronostic grave. Le tableau n° V indique les chiffres obtenus en tenant compte des valeurs de N et N' et en les présentant par ordre de taux croissant en glutathion réduit.

Comparativement, nous n'avons examiné que trois sangs d'adultes normaux qui nous ont fourni les chiffres suivants :

Cas n° 1	302	343
Cas n° 2	318	363
Cas n° 3	385	415

TABLEAU V

Glutathion réduit en milligrammes par litre de sang

	Avec le nitroprussiate de sodium	Avec l'empois d'amidon
Cas n° 1	126	134
» 2	128	145
» 3	131	161
» 4	142	169
» 5	144	174
» 6	176	209
» 7	181	210
» 8	188	221
» 9	184	225
» 10	191	227
» 11	189	237
» 12	198	249
» 13	201	249
» 14	206	253
» 15	202	266
» 16	224	277
» 17	235	282
» 18	241	284
» 19	238	292
» 20	244	293
» 21	239	297
» 22	247	297
» 23	289	333
» 24	298	337
» 25	292	338
» 26	302	346
» 27	298	347

Dans une deuxième série de dosages, nous avons utilisé la méthode de BINET et WELLER (32) basée sur la précipitation élective du glutathion par le lactate de Cadmium et son dosage ultérieur par l'iode.

Nous avons examiné, par cette méthode, le sang de sept sujets atteints de cancers divers, en opérant comparativement un dosage par l'iode en présence d'amidon. Voici les chiffres obtenus :

Cas	Dosage à l'iode en présence d'amidon	Dosage par la Méthode de BINET-WELLER
1	165	63
2	287	243
3	300	282
4	365	348
5		355
6	408,9	380
7	483,5	359

Sur trois sangs d'adultes normaux, nous avons obtenu les chiffres suivants :

Cas 1	401,5	
Cas 2	451,2	400
Cas 3	434,7	398,7

Sans entrer dans une discussion relative aux différences entre les chiffres fournis par les diverses méthodes, on peut conclure des chiffres ci-dessus que, dans la majorité des cas, on observe bien une baisse du taux de glutathion réduit au cours des états cancéreux.

Cette constatation ne vient pas à l'appui de l'hypothèse de FIESER et WOOD, bien qu'on puisse faire remarquer que le taux du glutathion réduit du sang n'est pas forcément le reflet du taux dans les tissus et spécialement dans les tissus tumoraux, qu'effectivement certains auteurs, entre autres : LECLOUX, VIVARIO et FIRKET (232) et HIRSCH (170 bis), trouvent plus riches en dérivés sulfhydrylés que les tissus normaux. Mais leurs résultats sont loin d'avoir été confirmés.

sur les cellules en culture

II. — Action du Glutathion et de ses acides aminés constitutifs

On sait que la technique de la culture des tissus animaux mise au point par CARREL, en 1912, est devenue une méthode expérimentale fructueuse, simple et pratique d'observation. Nous avons pu la pratiquer dans le laboratoire de cyto-biologie que dirige le Professeur Jean VERNE, à l'Institut du Cancer et nous devons d'ailleurs remercier ici ce maître éminent des conseils éclairés qu'il nous a dispensés.

Les tissus utilisés pour la culture étaient des fibroblastes provenant du cœur d'embryon de Poulet ayant huit jours d'incubation.

La technique employée a été la méthode dite « en goutte pendante ». Pour avoir des cultures dont la croissance était uniforme (cultures dites « stabilisées »), nous avons cultivé les fragments de cœur d'embryon de Poulet qui nous servait d'explant pendant quinze jours, et leur avons fait subir cinq à six repiquages pendant ce temps, donc avant toute expérimentation.

Au dernier repiquage, la culture était divisée en deux moitiés sensiblement égales. L'une servait de témoin ; dans l'autre, le milieu de culture était additionné d'une goutte d'une solution d'acide aminé ou du tripeptide dans du liquide de Ringer.

Nous avons expérimenté des solutions de diverses concentrations : 1 p. 200, 1 p. 500, 1 p. 1.000 et 1 p. 10.000. La concentration finale des substances essayées dans le milieu de culture ne représentait en réalité que le tiers de la concentration des solutions, puisque le milieu était constitué d'une goutte de plasma, d'une goutte de jus embryonnaire et

d'une goutte de solution. La goutte de solution de substance à expérimenter était ajoutée à la goutte de plasma et mélangée à cette dernière avant l'introduction du jus embryonnaire. Le milieu de culture était ainsi rigoureusement homogène. Pour avoir un point de comparaison bien précis, nous avons pris grand soin de préparer les cultures témoins dans des conditions aussi identiques que possible à celles des cultures expérimentales. C'est ainsi que nous avons dilué le milieu témoin d'une goutte de liquide de Ringer pour que les conditions soient les mêmes.

La lecture des résultats a toujours été faites 48 heures après la mise en culture. Dans quelques cas bien tranchés, l'examen microscopique direct nous a parfois suffi, mais, le plus souvent, nous avons dû utiliser des tests plus précis. Nous avons mesuré, d'une part, le coefficient mitotique des cultures ou rapport du nombre des cellules en division à celui des cellules quiescentes et, d'autre part, la surface de l'agrandissement de l'aire de croissance (toujours avec le même grossissement linéaire de projection, bien entendu). Nous avons associé constamment ces deux tests, étant persuadés que l'on ne peut tirer de conclusions que de leur ensemble et de leur comparaison.

Chaque solution a été expérimentée seize fois ; avec les seize cultures témoins, nous avons donc réalisé trente-deux cultures pour chaque variété.

Voici les résultats que nous avons obtenus :

1° L'acide glutamique et le glycocolle ont déterminé une élévation du coefficient mitotique et une augmentation de la surface de l'aire de pousse. Après 48 heures d'étuve, le coefficient mitotique moyen qui, pour les préparations témoins, était de 8, atteignait 12 pour les cultures faites en présence de glycocolle et 11 pour celles faites en présence d'acide glutamique.

2° La cystéine et le glutathion n'ont manifesté aucune action. Les cultures additionnées d'une de ces substances étaient identiques au témoin.

En utilisant la cystine à la place de la cystéine, nous avons eu la surprise d'observer une diminution générale de la croissance : quelques éléments cellulaires émigrent, quelques mitoses se font, mais la pousse est entravée. Le coefficient mitotique n'a jamais dépassé le chiffre de 4.

Les résultats que nous avons obtenus peuvent paraître surprenants dans le cas du glutathion dont on connaît, par ailleurs, le rôle important joué dans les processus de la division cellulaire et de la croissance ; mais il faut savoir que ce tripeptide et, d'une manière plus générale, les substances à groupe —SH, sont un des constituants du jus embryonnaire utilisé dans la culture des tissus. Sachs, Ephrussi et Rapkine (327) et Sachs (328) ont montré que les propriétés réductrices de ce jus étaient dues, en majeure partie, aux groupements —SH. Hueper et Russel (174) estiment à 40 mgr. environ la quantité de groupements —SH, exprimée

en glutathion, existant dans 100 cm³ de jus. Par ailleurs, VERNE et VERNE-SOUBIRAN (393) ont constaté, comme nous, que l'addition de glutathion à un milieu normal se montre sans action, en raison, sans doute, de la teneur déjà élevée du jus embryonnaire en groupements sulfhydrylés. En revanche, l'addition de glutathion à un jus où il a été détruit rend à ce jus une partie de son activité.

En tout cas, dans aucune de nos séries expérimentales et même avec des concentrations relativement très fortes (1 p. 200), nous n'avons pu observer, sur les cellules en cultures, la moindre anomalie faisant penser à une tendance à la malignité.

Nos résultats, là encore, ne sont pas favorables à la théorie de WOOD et FIESER.

III. — Recherche d'une libération éventuelle de substances à groupe —SH par action de carbures cancérigènes « in vitro » sur les protéides du sang

La difficulté, dans cette série de recherches, résidait dans la disparition rapide des substances à groupe sulfhydrylé dans le sang extravasé, raison pour laquelle, nous l'avons vu, lorsqu'on veut doser le glutathion du sang, on recueille celui-ci directement dans l'acide trichloracétique à 20 %.

Nous avons opéré de la manière suivante : le sang a été recueilli sur fluorure de sodium comme pour une glycémie; le prélèvement, qui est, en général, de 30 cm³, est divisé en deux portions ; à l'une d'elles, on ajoute du 3.4. benzopyrène, de manière à réaliser une concentration d'environ 1 p. 1.000. On agite à l'aide d'un petit agitateur permettant de broyer le carbure qui se dissout relativement bien, grâce aux lipides du sang. On abandonne une heure à la glacière ; au bout de ce temps, on traite le sang témoin et le sang additionné de benzopyrène par l'acide trichloracétique, dans les conditions habituellement utilisées pour le dosage du glutathion. On effectue ensuite le dosage par l'iode N/100 suivant la méthode classique.

Dans ces conditions, nous avons tout d'abord remarqué que le taux de glutathion ne subissait pas une diminution trop considérable par rapport à celui observé dans le sang défèqué sitôt son prélèvement ; cette diminution est, en général, de l'ordre de 20 à 25 %, variable d'ailleurs avec les échantillons de sang.

Pour ce qui est de l'action du carbure, nous n'avons pas noté de différences bien nettes et surtout systématiques dans le taux de glutathion par rapport au témoin.

Nous avons abouti aux mêmes conclusions en opérant avec deux autres

carbures cancérigènes : le 1.2.5.6. benzanthracène et le méthylcholanthrène. Nous avons enfin ajouté au sang une substance à groupe — S — S — : la cystine :

$$\begin{array}{l} S - CH_2 - CH(NH_2) - CO_2H \\ | \\ S - CH_2 - CH(NH_2) - CO_2H \end{array}$$

à des doses variant de 0 gr. 02 à 0 gr. 10 pour 100 cm³ de sang et nous n'avons pas observé, en présence de l'un ou l'autre des trois carbures cancérigènes utilisés par nous, délibération de groupes — SH à partir de cette substance.

Buu-Hoï (62) a effectué des expériences dans le même sens que nous. Il a opéré non plus sur le sang, mais directement sur la cystine qu'il a traitée en milieu homogène par toute une gamme de produits d'activités cancérigènes très différentes : le méthylcholantrène, le 3.4. benzopyrène, le 1.2.5.6. dibenzanthracène, le 1.2.5.6. dibenzofluorène et la 1.2. 5.6. dibenzacridine. Il n'a observé, en utilisant la réaction colorée au nitroprussiate de sodium, aucune libération de groupes — SH. Par ailleurs, se basant sur le fait connu que les groupes — S — S — sont nécessaires à l'activité de l'insuline, il a fait agir sur cette hormone ,pendant plusieurs jours, un grand excès de méthylcholanthrène en solution alcoolique. L'Insuline ainsi traitée a donné, sur le Lapin, le même abaissement glycémique qu'un échantillon témoin.

Les résultats de notre troisième série d'expériences, auxquels se joignent ceux obtenus par Buu-Hoï, ne sont donc pas non plus favorables à l'hypothèse de Wood et Fieser.

TROISIEME PARTIE

RECHERCHES SUR L'ACTION CANCÉRIGÈNE ÉVENTUELLE DE SUBSTANCES ALIMENTAIRES

Nous avons, dans la première partie de notre travail, exposé l'hypothèse d'après laquelle rien ne s'oppose *a priori* à admettre que la genèse du cancer spontané résulte de facteurs chimiques, comme le cancer expérimental que nous avons provoqué avec des substances de synthèse. De tels facteurs chimiques ne peuvent provenir que de l'alimentation ou d'une synthèse endogène. Nous envisagerons tout d'abord les facteurs alimentaires et ce sera l'objet de cette troisième partie.

On sait que les facteurs chimiques de l'alimentation peuvent intervenir aussi bien par leur carence, comme c'est le cas pour les vitamines ou les éléments oligo-dynamiques, que par leur excès. Or, une théorie très répandue attribue le développement du cancer à une carence en Magnésium. C'est pourquoi, après avoir exposé les arguments pour et contre cette théorie, nous apporterons notre contribution personnelle au problème du Magnésium dans le cancer. Ce sera le premier chapitre de cette troisième partie.

Dans un deuxième chapitre, nous étudierons, du point de vue de son action cancérigène éventuelle, un produit riche en stérols et en vitamines dont l'action se rapproche de celle des hormones sexuelles : l'huile de germe de Blé.

Enfin, dans un troisième chapitre très court, nous relaterons quelques expériences avec une substance de synthèse : l'acide α naphtylacétique, dont les propriétés sont celles d'une phytohormone, c'est-à-dire d'une substance excitant la croissance des Végétaux, analogue à celles isolées des plantes ou de l'urine humaine par l'Ecole hollandaise de Kögl (Auxines).

CHAPITRE PREMIER

MAGNÉSIUM ET CANCER

I. — RECHERCHES ANTÉRIEURES

De très nombreux travaux ont été effectués sur le rôle du Magnésium dans le cancer.

On peut les classer en trois groupes :

1° Ceux ayant trait à l'action des sels de Magnésium chez des malades ou des animaux cancéreux ;

2° Ceux ayant trait à la corrélation entre la fréquence du cancer et la teneur en Magnésium du sol et des aliments ;

3° Ceux ayant trait au taux de Magnésium des tissus et des humeurs chez les malades ou les animaux cancéreux.

1° Parmi les recherches sur l'action des sels de Magnésium dans les états cancéreux, il faut citer d'abord celles de Dubard (110), qui fut le premier à recommander les sels de Magnésium comme traitement prophylactique ou curatif du cancer. Vinrent ensuite les travaux de Reding et ses collaborateurs (298) et surtout les nombreuses publications de Delbet et de ses collaborateurs (92), pour lesquels, également, le Magnésium, spécialement sous forme de chlorure, est un préventif du cancer. Delbet et ses élèves introduisirent dans la vésicule biliaire du Cobaye des calculs biliaires humains. Cette greffe est suivie d'une apparition fréquente du cancer de la vésicule biliaire, cancer identifié, tant par son évolution clinique que par les images histologiques caractéristiques. Or, les animaux traités par les sels halogénés de Magnésium, ne présentèrent que des modifications insignifiantes de la paroi vésiculaire. Ces auteurs montrèrent ensuite l'action inhibitrice du chlorure de Magnésium ingéré ou injecté sur la croissance des tumeurs greffées chez la Souris ; puis, ils badigeonnèrent avec du goudron des Lapins au niveau de l'oreille. Un lot d'animaux ainsi badigeonnés fut soumis au traitement magnésien ; les badigeonnages au goudron furent arrêtés dès l'apparition des papillomes. Chez les animaux traités par le chlorure de Magnésium, les papillomes se ratatinèrent, aussitôt que le badigeonnage au goudron fut interrompu, tandis que, chez les témoins, les papillomes évoluèrent en cancers. Enfin, les auteurs publièrent un certain nombre d'observations de cancers humains influencés favorablement par le traitement magnésien.

Les résultats favorables de Delbet, qui ont fait l'objet des critiques de Cavers (66) et de Shear (355), à cause surtout du trop petit nombre d'animaux expérimentés, ont été confirmés par Kotzareff, de Morsier et Morin (211) sur la Souris, Marullaz (255) sur le Lapin, Maisin (252) sur la Souris et Thomas et Kreitmann (380) sur le Poisson.

En revanche, divers auteurs n'ont observé aucune influence favorable du Magnésium. C'est le cas, en particulier, de Itami (179), Katase, Kawamura et Mizutani (192), Hoshino (171), Sugiura et Benedict (369), Bolaffi (37), Cilotti (70), Severi (348), Kreyberg et Schrae-der-Nielsen (213), Braier (47), Serbescu (339 *bis*), Moravek (262), et surtout Brumpt (53). Ce dernier auteur a étudié l'action de l'administration alimentaire de sels de Magnésium sur le développement du cancer chez des Souris prédisposées à la cancérisation spontanée : sur quatre-vingt-neuf Souris traitées au Magnésium (doses très supérieures à celles utilisées par Delbet), vingt-sept ont présenté un cancer spontané, tandis que, dans le lot témoin, sur cent trente-quatre animaux, seuls vingt-quatre ont été atteints. Les résultats de Brumpt s'opposent donc diamétralement à la théorie du rôle anticancérigène du Magnésium, de même d'ailleurs, que ceux de Katase et ses collaborateurs (192) et aussi de Sugiura et Benedict (369) (doses comparables à celles utilisées par Delbet), puisque, dans les expériences de ces divers auteurs, une alimentation riche en Magnésium exerce sur la croissance du tissu tumoral un effet plutôt stimulant.

2° Pour ce qui est des travaux ayant trait à la corrélation entre la fréquence du cancer et la teneur en Magnésium du sol et des aliments, il faut citer : tout d'abord Marchi (253) qui signale une fréquence beaucoup plus grande de cancers dans des régions d'Italie à sol pauvre en Magnésium, par exemple à Ravenne, que dans celles à sol riche en Magnésium, par exemple à Cagliari ; ensuite Robinet (309) qui, d'après les statistiques établies pour les divers départements français, aboutit aux mêmes conclusions que l'auteur italien. La même thèse a été soutenue par Schrumpff-Pierron (245). Cet auteur affirme que le cancer est remarquablement rare chez les indigènes égyptiens et, en particulier, chez les Fellahs qui mènent une existence très sobre. Il attribue ce fait à la richesse du sol en Magnésium qui se répercuterait nécessairement sur la teneur en Magnésium des céréales et surtout du Maïs, qui constituent l'alimentation dominante des indigènes. Rablet et Bader (8) arrivent aux mêmes conclusions en ce qui concerne l'Indochine. Gunsett (150), puis Sartory et ses collaborateurs (335), qui ont repris ces recherches en Alsace-Lorraine, arrivent à des conclusions totalement différentes. Enfin, Brumpt (53), de même que Dolbey et Mooto (106), conteste la rareté du cancer chez les Fellahs, qui, d'après lui, est due à une insuffisance des statistiques.

3° Tout aussi divergents sont les résultats obtenus dans les déterminations des taux de Magnésium des tissus ou des humeurs d'animaux ou de malades humains cancéreux. Il faut surtout citer de ce point de vue les recherches de Clowes et Fribie (72), Blum et Klotz (35), Theis et Benedict (379), Kimura (198), Louros et Gaessler (246), Eicholtz (115), Giovannoni (144), et Laemmer (225).

Comme on le voit, et comme l'a très bien souligné l'auteur américain Shear (355), qui a consacré au problème des rapports entre les ions minéraux (Calcium, Magnésium, Sodium et Potassium) et le cancer une revue extrêmement documentée, les résultats obtenus et les conclusions qu'on en a tirées sont très divergents.

II. — RECHERCHES PERSONNELLES

A) — Le Magnésium sanguin dans les états cancéreux

Il nous est apparu, étant donné l'importance du problème, qu'il y aurait intérêt à rechercher la teneur en Magnésium dans le sang des cancéreux comparativement aux sujets normaux, en opérant sur un grand nombre de sujets et avec une technique sûre.

Nous avons examiné 101 malades sur lesquels nous avons pratiqué 150 dosages.

La technique utilisée a été celle mise au point au laboratoire du Professeur Fleury, par Glomaud (145). Cette technique, rappelons-le, est basée sur la précipitation par l'o. oxyquinoléine en milieu ammoniacal, après séparation du Fer et du Calcium, avec détermination ultérieure bromométrique de l'o. oxyquinoléine combinée au Magnésium.

Les dosages ont été effectués sur le sérum.

Voici les résultats que nous avons obtenus :

1° Les chiffres du Magnésium sanguin chez les cancéreux oscillent entre 14 et 29,5 mg. par litre, avec un taux moyen de 20 à 23 mg. sensiblement identique à celui observé par Velluz (392) sur 70 sujets normaux et par nous-même sur 24 sujets normaux. D'une façon plus précise, sur 150 dosages, 58 s'inscrivent entre 15 et 20 mg., et 90 entre 20 et 25 mg. avec, comme chiffres exceptionnels, un cas avec 14 mg. (réticulo-sarcome chez un enfant) et un cas avec 29,5 mg. (épithélioma d'un adulte en pleine poussée évolutive).

2° Sans insister sur le point de vue clinique qui a fait (173) ou fera l'objet de communications plus détaillées en collaboration avec Huguenin, nous voudrions souligner quelques points mis en évidence par le dépouillement des observations. Il n'y a pas de taux particulièrement inhérents à certaines variétés de cancers : en revanche, pour des cancers semblables, les chiffres sont souvent différents ; ainsi, dans des cancers très étendus et métastatiques, nous avons trouvé tantôt des taux relativement bas (16 à 17 mg.), tantôt des taux relativement élevés (22 à 24 mg.) ; en contrepartie, chez des malades atteints de tumeurs non malignes, nous avons également observé des taux tantôt relativement bas (16 à 18 mg.), tantôt relativement élevés (23 à 26 mg.).

En conclusion, nos nombreux dosages ne nous ont pas montré de relation entre le taux du Magnésium sanguin et l'existence d'un cancer ou la malignité évolutive de celui-ci.

B) — Magnésium et Activité phosphatasique alcaline du sang dans les états cancéreux

Nous avons, dans un certain nombre de cas, eu l'idée de déterminer simultanément le taux du Magnésium et l'activité phosphatasique alcaline.

En effet, divers auteurs, entre autres KAY (193), KOEHLER (207), LUBENSTEIN (247), et GUTMAN (152), ont signalé la fréquente augmentation de l'activité phosphatasique du sérum chez les cancéreux, particulièrement lors de l'apparition de métastases.

Comme l'ont fait remarquer KAY, KOHLER, SCHOONOVER et ELY (344) et plus récemment ROCHE et ses collaborateurs (311), l'augmentation de l'activité phosphatasique dans le sérum peut tenir aussi bien à une variation dans les facteurs d'activation de l'enzyme qu'à un excès de celle-ci.

Parmi les activateurs de la phosphatase alcaline, les plus importants sont des métaux divalents et en particulier le Zinc, le Manganèse et le Magnésium.

Le rôle de l'ion Magnésium dans l'activité phosphatasique a été souligné en particulier par ERDTMAN (117) et surtout JENNER et KAY (186). En 1942, par ailleurs, SNYDER et TWEEDY (359) soumettant des Rats normaux à des régimes carencés en Magnésium, ont montré que la diminution en Magnésium du sérum s'accompagnait d'une diminution de l'activité phosphatasique.

Nous avons pensé, dans ces conditions, qu'il y aurait intérêt à effectuer parallèlement dans le sérum des cancéreux, le dosage du Magnésium et de la phosphatase alcaline.

L'activité phosphatasique a été déterminée par la méthode de BODANSKY (hydrolyse du β glycérophosphate à pH = 8,6, pendant une heure à 37°), telle qu'elle nous a été enseignée par notre ami Jean COURTOIS.

Notre étude a porté sur 37 sujets atteints de cancers variés dont 33 épithéliomas et 4 sarcomes, et sur 10 sujets normaux ou atteints d'affections non cancéreuses.

Chez les cancéreux, le taux maximum de phosphatase alcaline observé a été de 17.28 U. BODANSKY, et le taux minimum de 0,32, avec des taux de Magnésium correspondants de 21.1 et 18 mg.

Dans la majorité des cas, le taux de la phosphatase alcaline oscillait entre 1,5 et 4 U. BODANSKY.

Le taux maximum de Magnésium a été 26 mg. et le minimum 14 mg. avec des taux correspondants de phosphatase alcaline de 2,08 et 3,04. La plupart des chiffres de Magnésium étaient aux environs de 19-20 mg.

Chez les non cancéreux :

Un cas de maladie de Recklinghausen a donné un taux de phosphatase de 75,84 et un cas de maladie de Paget 34,24 U. Bodansky, avec des taux de Magnésium respectifs de 18,8 et 21, les autres taux de phosphatase alcaline ou de Magnésium étant sensiblement de même ordre que ceux observés chez les cancéreux.

En conclusion, les chiffres que nous avons obtenus montrent avec évidence que, s'il existe une corrélation entre l'activité phosphatasique alcaline et le taux de Magnésium du sang, elle est masquée par d'autres facteurs et ne se manifeste pas dans les taux observés dans notre étude.

C) — Le Calcium sanguin dans les états cancéreux

La technique employée pour le dosage du Magnésium, permettant facilement la détermination simultanée du taux de Calcium, nous avons, en même temps que le Magnésium, dosé cet élément chez de nombreux sujets cancéreux. Nous y avons été incités par les travaux récents de Suntzeff et Carruthers (371). Ces auteurs, étudiant, chez la Souris, les modifications de la composition minérale de l'épiderme, lors de la cancérisation par le méthylcholanthrène, ont en effet observé, en quelques jours, un abaissement considérable (plus de 50 et jusqu'à 80 %) du taux du Calcium. Ils en ont conclu que cet abaissement était un facteur important de la carcinogénèse. Le Calcium est d'ailleurs, parmi les constituants minéraux du sang dont les variations ont été étudiées au cours des états cancéreux, celui qui, avec le Potassium, a donné lieu au plus grand nombre de recherches. Celles-ci, effectuées soit sur l'animal, soit sur l'homme, n'ont malheureusement pas conduit à des résultats concordants, même si l'on rejette systématiquement, comme nous l'avons fait, les chiffres obtenus sur le sang total et non sur le sérum.

Beaucoup d'auteurs et en particulier Beebe (19), Clowes et Fribie (72), Goldzieher (146), Theis et Benedict (379), Remond, Sendrail et Lasalle (305), Leicher (233), Svehla (373), Reding (299), Reding et Slosse (300), Harnes (160), Konopleff (209), Beregoff (20), et surtout Mac Donald (249) signalent une hypocalcémie fréquente chez les cancéreux et cette constatation, ajoutée à celle d'une augmentation du Potassium spécialement par Louros et Gaessler (246), Remond et Cantegril (306) et aussi Giaccobe (142), a conduit à une théorie concernant le rôle du rapport Potassium-Calcium dans l'évolution du cancer dont certains auteurs ont tiré des conséquences thérapeutiques, appuyées d'ailleurs sur des expériences *in vitro* ou *in vivo* qui, à vrai dire, sont loin d'avoir toutes été confirmées.

Mais beaucoup d'auteurs et en particulier, Krehbiel (212), Blum et Klotz (35), Margolin (254), Goerner et Shafiroff (147), Nikolskij (276), Schepetinsky et Kafitin (338), Pitts et Johnson (288), Gunther et Greenberg (151), Louros et Gaessler (310), De Fermo (90), Kentaro (197), Moraveck (263), Tabanelli (374), Waterman (399), Dyer et Roe (113), Jackson et Taylor (180), Bowman, Pitts, Michell et Ewertz (42), trouvent chez les cancéreux une calcémie normale, ou expliquent les abaissements constatés par des circonstances autres que le cancer lui-même, telles que la cachexie ou l'âge avancé.

Certains auteurs, enfin, signalent de l'hypercalcémie au cours du cancer : Fukunaga et Nagaoka (135), dans le sarcome de Kato du Lapin ; Gutman, Tyson et Gutman (153), dans certaines métastases osseuses ostéolytiques ; Stern Pavao (281), dans les tumeurs cutanées.

En face de ces résultats divergents, voici, brièvement condensés, nos résultats personnels :

Nos examens ont porté sur 114 sujets cancéreux ou porteurs de tumeurs bénignes, chez lesquels nous avons effectué 167 dosages.

1° Sur nos 167 déterminations de la calcémie, 58 étaient au-dessous de 95 mg., 71 au-dessus de 105 mg. et 38 seulement entre 95 et 105 mg. Les dosages effectués parallèlement sur 33 sujets normaux : 16 hommes et 17 femmes de 20 à 60 ans, nous ont donné des chiffres variant seulement de 98 à 105 mg., sauf un cas à 90 mg. s'expliquant éventuellement par une nette hérédité hémophile.

2° Sans insister sur le point de vue clinique qui a fait ou fera l'objet de communications plus détaillées en collaboration avec Huguenin (176), nous noterons quelques points mis en évidence par le dépouillement des observations :

La calcémie était à un taux normal aussi bien dans des cas de cancers à évolution favorable que dans des cas à évolution mortelle et aussi bien dans des cas de petits cancers que dans des cas de cancers largement étendus et riches de métastases.

L'hypercalcémie fut observée aussi bien dans des cancers très malins (14 cas), que dans des cancers à évolution favorable (9 cas) ou des cas de tumeurs malignes.

L'hypocalcémie fut observée dans des proportions à peu près analogues, dans des cancers d'évolution favorable (4 cas), dans des cancers évolués et de mauvais pronostic (6 cas), et chez des sujets non cancéreux (5 cas) dont trois présentaient des lésions osseuses non malignes.

En résumé, le taux du Calcium sanguin chez les cancéreux ne semble lié, comme celui du Magnésium, ni à l'existence, ni à la localisation, ni au degré évolutif du cancer. S'il y a carence en ces deux éléments chez le cancéreux, cette carence ne se manifeste pas de façon systématique dans leurs concentrations humorales.

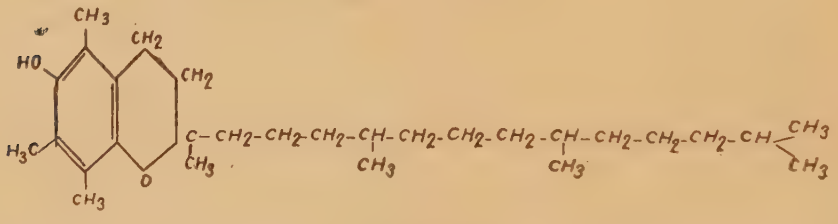
CHAPITRE II

RECHERCHES SUR L'ACTION CANCÉRIGÈNE ÉVENTUELLE DE L'HUILE DE GERME DE BLÉ

I. — CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES

Les expériences de LACASSAGNE, que nous analyserons dans la quatrième partie, avaient montré l'action favorisante de la folliculine et, d'une façon générale, des hormones œstrogènes sur le développement de certains cancers. Il nous a semblé intéressant de rechercher quelle pourrait être l'influence de ce point de vue de substances biochimiques du groupe des vitamines liposolubles : les vitamines E ou vitamines de fertilité. On sait, en effet, que ces vitamines indispensables sont non seulement au fonctionnement normal des organes sexuels, mais encore, selon toute vraisemblance, à toute division cellulaire. ADAMSTONE (1), d'après les résultats de ses expériences sur le Poulet, avait même pensé à une intervention possible de ces vitamines dans les processus de malignité.

A l'époque (1936) où nous avons commencé ces expériences, EVANS, EMERSON et EMERSON (118) venaient à peine de publier leurs résultats sur l'isolement, sous forme d'allophanates, à partir de l'huile de germe de Blé, principale source naturelle de vitamines E, de substances actives qu'ils appelèrent les tocophérols, en raison précisément de leur action favorable sur la sphère génitale, en particulier sur les phénomènes de parturition (de τοκος portée, et αειρω, je porte)



α TOCOPHÉROL

Ce n'est qu'en 1938 que KARRER et DEMOLE (191) parvinrent à en réaliser la synthèse à partir d'une hydroquinone substituée et du bromure de phytyle.

Aussi, avons-nous utilisé pour nos essais l'huile de germe de Blé qui, comme nous l'avons vu, a servi à EVANS et ses collaborateurs pour l'isolement des substances vitaminiques E et en est de loin la source naturelle la plus riche. Notre travail était à peine commencé que trois chercheurs américains, ROWNTREE, LANSBURY et STEINBERG (322), travaillant d'ailleurs dans un but différent, annoncèrent qu'ils avaient obtenu des cancers chez le Rat par ingestion d'huile de germe de Blé.

L'huile de germe de Blé, utilisée par ces auteurs, était obtenue par extraction à l'éther du germe de Blé frais, avec enlèvement des acides gras par lavages à la soude diluée de l'extrait éthéré. Cette huile a été administrée à des Rats soumis à un régime standard à des doses variant en général de 1 cm³ à 4 cm³ par animal et par jour. Les auteurs ont eu la surprise de voir apparaître, en des temps très courts, quinze jours seulement pour certains animaux, des tumeurs abdominales sarcomateuses aisément transplantables. Ces résultats, confirmés par DORRANCE et CICCONE (108) ont été, par la suite (323), précisés sur certains points : les auteurs ont ainsi montré que d'autres espèces que le Rat, la Souris et le Cobaye en particulier, ne faisaient pas de cancer dans les mêmes conditions. Ils ont, par ailleurs, souligné l'importance de la méthode de préparation de l'huile de germe de Blé : une huile extraite par la gazoline s'est montrée inactive; de même, un extrait concentré de vitamine E; enfin, le germe de Blé frais, mélangé, dans la proportion de 50 % au régime des Rats, n'a provoqué aucune tumeur.

Le résultat obtenu par ROWNTREE et ses collaborateurs était d'une très grande importance, car, s'il s'avérait exact, on aurait, pour la première fois, démontré l'influence d'un facteur chimique d'origine alimentaire dans la genèse du cancer. Il nous faut toutefois remarquer que, normalement, lors de la mouture du Blé, en vue de l'obtention de la farine destinée à la fabrication du pain, on élimine le germe (qui représente en poids 15 %), car l'huile qu'il renferme risquerait de communiquer, après rancissement, un mauvais goût au pain. Mais cette élimination du germe peut parfois et surtout dans des circonstances anormales, telles que celles que nous avons traversées et que nous continuons à vivre, être mal réalisée et, par ailleurs, d'autres aliments que le germe de Blé et, en particulier, l'huile d'Arachide, le Cresson, la Salade, renferment des quantités appréciables de vitamines E.

Nous avons alors orienté nos expériences dans le sens d'une vérification de celles des auteurs américains.

II. — PRÉPARATION DE L'HUILE DE GERME DE BLÉ

Le germe de Blé frais nous a été fourni par les Grands Moulins de Paris. La quantité mise en œuvre pour l'extraction de l'huile était de l'ordre de 5 kg. par opération.

Le mode d'épuisement adopté était la lixiviation à l'aide d'un percolateur en cuivre qui nous avait été très aimablement fourni par les Etablissements Octave BAILLY. On humecte d'abord avec 5 ou 6 litres d'éther et on laisse macérer 24 heures. On procède alors à lixiviation, en ajoutant au fur et à mesure de nouvelles quantités d'éther. La quantité de solvant utilisée pour 5 kg. de germe de Blé était de l'ordre de 20 litres.

L'éther employé était de l'éther anhydre privé de peroxydes. Pour le

préparer, nous avons rectifié l'éther sur du chlorure stanneux et nous l'avons ensuite conservé dans des flacons en verre jaune, sans dépasser huit jours de conservation. Pour contrôler l'absence de peroxydes, on agite l'éther dans un tube à essais avec un peu de solution d'iodure de potassium à 2 % acidifiée avec II gouttes d'acide acétique. Il ne doit pas y avoir de libération d'iode.

La liqueur éthérée obtenue par la lixiviation (environ 15 à 16 litres) est filtrée, pour séparer un léger précipité blanchâtre qu'elle renferme. On la lave ensuite, dans une grande ampoule à décantation, avec une solution aqueuse à 4 % de soude pour enlever les acides gras libres. On agite soigneusement. Parfois, il se forme une émulsion à la zone de séparation entre la liqueur éthérée et la solution alcaline. On la détruit facilement par addition d'un peu d'alcool. Finalement, on sépare la liqueur alcaline et on lave, à quatre reprises, avec 7 ou 8 litres d'eau distillée, en agitant. La dernière eau de lavage ne doit plus être alcaline au tournesol, sinon on continue les lavages à l'eau distillée. On laisse ensuite reposer 24 heures pour bien séparer l'eau. Puis, on filtre sur papier filtre bien sec que l'on change à plusieurs reprises au cours de la filtration. On obtient finalement une liqueur éthérée parfaitement limpide, colorée en jaune. On la soumet à la distillation au bain-marie, sans dépasser 35°. L'éther ainsi recueilli est récupéré et sert pour de nouvelles extractions du germe de Blé, ainsi d'ailleurs que celui qu'on peut recueillir en soumettant à la distillation, dans les mêmes conditions, les germes de Blé épuisés restant dans le percolateur. Quand la température commence à monter, on continue la distillation avec une pompe à vide en opérant en atmosphère d'azote. On obtient finalement une belle huile jaune rougeâtre. Le rendement en huile est de l'ordre de 7 % du poids de germe de Blé traité.

Dans cette préparation de l'huile destinée à notre expérimentation, nous avons soigneusement veillé à éviter toute température pouvant dépasser 70°. Nous avons voulu ainsi nous mettre à l'abri de la production éventuelle de substances cancérigènes, à partir de substances du groupe des lipides, sous l'influence de la chaleur, qui a été signalée par divers auteurs. Nous avons rappelé, dans la deuxième partie de ce travail, les résultats obtenus dans ce sens par Beck (18) avec l'huile de Coton et par Steiner, Steele et Koch (363) avec l'huile de Sésame. Nous ajouterons que Roffo (312) aurait obtenu chez le Rat blanc, des cancers de l'estomac, du cæcum et du foie, par ingestion de substances alimentaires riches en stérols, soit animales (graisses de Mouton, Porc et Bœuf), soit végétales (huile d'Olive), soumises à une ébullition de 30 minutes et ajoutées à l'alimentation ordinaire de l'animal. De même, Widmark (409) a soumis à l'action d'une température de 275° du beurre, du café et du muscle de Cheval. Il a effectué ensuite une extraction à l'alcool ou à l'éther de pétrole des substances ainsi chauffées, et pratiqué avec les

extraits obtenus, comparativement avec ceux préparés à partir des mêmes substances non chauffées, des badigeonnages cutanés chez la Souris. Il a obtenu 9 cancers de la mamelle contre un seul dans la série témoin. En partant de cholestérol pur, émulsionné dans l'huile de Coco et chauffé également à 275°, il a pu, toujours après badigeonnages cutanés chez la Souris, observer un cas de sarcome fuso-cellulaire de la région badigeonnée. Waterman (400) a montré enfin que l'ingestion prolongée de graisses surchauffées à des températures voisines de 200° produit, chez la Souris, des lésions de l'estomac allant de la gastrite chronique simple jusqu'aux papillomes, adénomes, carcinomes spino-cellulaires et même aux tumeurs du foie. D'après lui, ce serait les esters du cholestérol que la chaleur transformerait en substances cancérigènes. Nous reviendrons sur ce problème de l'action de la chaleur sur les stérols dans la quatrième partie de ce travail.

III. — EXPÉRIMENTATION SUR LE RAT

Nous avons opéré sur 25 Rats blancs mâles, âgés de 3 à 4 mois.

Voici tout d'abord la composition de leur régime alimentaire :

Flocons d'avoine Heudebert	3 kg.
Maïs écrasé	12 kg.
Poudre de viande Byla.....	2 kg. 800
Lait total pulvérisé Gervais	2 kg.
Chlorure de sodium	0 kg. 200
Huile de foie de Morue	0 kg. 250

Ce régime est tout à fait comparable à celui utilisé par Rowntree et ses collaborateurs pour leurs expériences. Nous avons seulement remplacé la viande sèche par de la poudre de viande. En effet, nos essais pour dessécher à 40°, dans un appareil spécial à ventilation, la viande découpée en lanières, ont été infructueux : la viande poisse et se dessèche mal.

Chaque Rat consommait journellement en moyenne 15 gr. du mélange ci-dessus, auquel nous ajoutions un peu de salade crue et de l'eau à volonté.

Les animaux ont été répartis en 4 lots :

Un lot témoin (5 Rats) a été soumis au régime de base.

Pour les trois autres lots, ce régime fut additionné, dans la proportion de 5 cm^3, pour les 15 gr. quotidiens de nourriture d'un animal, d'huile de germe de Blé obtenue par trois techniques d'extraction différentes :

Huile extraite par le toluène (fournie par les Etablissements Byla) pour le lot n° 2 (5 Rats).

Huile extraite par l'éther de pétrole et l'alcool éthylique (fournie par les Etablissements Roussel) pour le lot n° 3 (5 Rats).

Huile extraite du germe de Blé frais par la méthode indiquée plus haut pour le lot n° 4 (10 Rats).

Nous avons poursuivi l'administration des diverses huiles pendant onze mois. Très rapidement, chez les animaux du lot n° 3 et surtout du lot n° 4, il est apparu à la palpation abdominale de petits modules. Mais, à l'autopsie, ces nodules se sont montrés être, soit des nodules inflammatoires, soit des ganglions lymphoréïques, soit des fœcalomes. Dans aucun cas, il n'a été obtenu de tumeurs. Dans un seul cas, il a été observé, chez un des Rats, au niveau de la paroi cæcale et du colon, une hyperplasie papillomateuse. Nous n'avons rien observé chez les Rats du lot témoin, non plus que chez ceux du lot n° 2, dans lequel l'un des animaux a seulement présenté un petit kyste rénal.

Nos résultats négatifs ont été confirmés par divers expérimentateurs et en particulier par Auchincloss et Haagensen (7), Blumberg (36), Brues, Marble et Riegel (52), Carruthers (65), Dittmar et Burschkies (98) et, tout récemment, Harris (159). En revanche, ce dernier auteur, par injections sous-cutanées ou intrapéritonéales répétées, a réussi à obtenir des sarcomes chez 5 % des 40 Souris mises en expérience et chez 8 % des 200 Rats expérimentés. Il considère que ce résultat, qui cadre avec celui obtenu dans la dernière publication de Rowntree avec Ziegler (324), ne peut être envisagé comme une réaction spécifique, mais plutôt comme une réaction d'irritation chronique, comparable à celles observées avec d'autres solvants lipidiques, en particulier les solvants lipidiques soumis à l'action de la chaleur.

Nous soulignerons, à nouveau, que nous avons bien pris soin d'éviter tout chauffage au-dessus de 70°, lors de la préparation de notre huile.

Pour être complet sur cette question de l'huile de germe de Blé, nous ajouterons qu'en 1934, Davidson (89) avait montré qu'un régime riche en vitamines E inhibait la cancérisation par le goudron chez la Souris : cependant qu'en 1937, Haddow et Russel (155) signalèrent que l'addition d'huile de germe de Blé au régime de la Souris n'a aucune influence sensible sur le pourcentage et le délai d'apparition des tumeurs cutanées chez cet animal badigeonné avec du 3.4. benzopyrène. Il en est de même, comme l'a montré Sugiura (370), vis-à-vis de l'action cancérigène hépatique du *p.* diméthylaminoazobenzène, administré *per os* au Rat : cependant que Di Grazia et Rasa (96) ont montré qu'une vitamine E pure : l'α tocophérol provoquait, chez la Souris soumise à des badigeonnages cutanés par le 3.4. benzopyrène, un raccourcissement de la période de latence pour la production des papillomes et un retardement pour leur cancérisation. Enfin, à l'Institut du Radium de Paris. M^me^ Dobrowolskaïa-Zavadskaïa et Adamova (102), ont traité, par administration buccale d'une solution huileuse d'α tocophérol à 50 %, 13 Souris femelles avec 21 tumeurs spontanées (adénocarcinomes de la mamelle) et 10 Souris mâles avec 11 tumeurs provoquées par injection de 1.2.5.6 dibenzanthracène (sarcomes fuso-cellulaires). La dose administrée, tantôt chaque jour, tantôt une ou deux fois par semaine, était de une goutte de solution

huileuse par animal. Les auteurs ont observé que l'α tocophérol se montrait capable, surtout en administration quotidienne, d'influencer favorablement la restriction de croissance des tumeurs spontanées de la mamelle chez la Souris et de prolonger la survie des animaux. En diminuant l'intensité du traitement, on risque le danger d'un effet stimulant la croissance. L'action de l'α tocophérol fut moins favorable pour les sarcomes chez les mâles et le risque de stimulation s'est montré plus grand.

Toujours en rapport avec les vitamines E, il faut noter que, d'après MUELLER, MILLER et RUSCH (268), l'α tocophérol se comporte comme un antioxygène vis-à-vis de l'oxydation des carbures cancérigènes, tels que le 3.4. benzopyrène et le méthylcholanthrène, dissous dans des solvants lipidiques auto-oxydables comme l'acide linoléïque.

En résumé, on ne peut absolument pas considérer l'huile de germe de Blé, non plus que les vitamines E qu'on en peut extraire, comme substances cancérigènes.

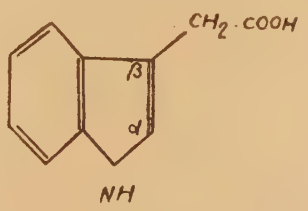
CHAPITRE TROISIEME

RECHERCHES SUR L'ACTION CANCÉRIGÈNE ÉVENTUELLE D'UNE PHYTOHORMONE SYNTHÉTIQUE : L'ACIDE α NAPHTYLACÉTIQUE

I. — CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES

On sait que, à la suite surtout des magnifiques travaux de l'Ecole hollandaise de KÖGL (208), ont été découvertes des substances douées de la propriété d'exciter la croissance chez les Végétaux.

Ces substances ont été désignées sous le nom d'AUXINES, nom tiré d'un mot grec qui signifie : faire croître. On les appelle aussi souvent des PHYTOHORMONES, pour rappeler leur action à distance, comparable à celle des hormones animales. Elles existent aussi bien dans les matières végétales que dans les matières animales. On les trouve en particulier dans l'urine et l'une d'entre elles, l'HÉTÉRO-AUXINE ou acide indol-β-acétique, est un produit banal résultant du métabolisme du tryptophane.



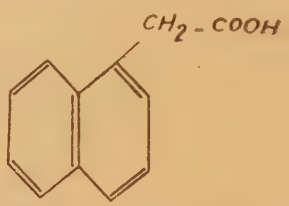
ACIDE INDOL — β — ACÉTIQUE

Certaines d'entre elles enfin, ont été réalisées par synthèse, c'est le cas de l'acide α — naphtylacétique :

Différentes raisons nous ont incité à rechercher l'action cancérigène éventuelle de telles substances vis-à-vis de l'animal :

1° Leur présence dans les aliments végétaux, tels que le Malt, la Levure de bière, l'huile de Maïs, etc...

2° Leur présence dans l'organisme animal ;



ACIDE α — NAPHTYLACÉTIQUE

3° L'obtention, dans des expériences personnelles, encore non publiées, de tumeurs chez les Végétaux, sous l'influence, dans certaines conditions, de ces substances. D'autres auteurs, et en particulier LOCKE, RIKER et DUGGAR (243) avec l'acide indol-β-acétique, et BRAUN et LASKARIS (48) avec l'acide α-naphtylacétique, ont obtenu des résultats analogues.

II. — EXPÉRIMENTATION SUR LA SOURIS

Nous avons opéré sur 15 Souris, que nous avons réparties en 3 lots :

Dans le lot 1 (5 Souris), chaque animal a reçu en injection sous-cutanée, dans la région du dos, 0 cm³ 5 de solution aqueuse au 1/10.000 d'acide α-naphtylacétique, à six reprises, à une semaine d'intervalle entre chaque injection ;

Dans le lot 2 (5 Souris), chaque animal a reçu, en injection sous-cutanée, dans la région du dos, 0 cm³ 5 de solution au 1/1.000 d'acide naphtylacétique dans l'huile d'Olive neutralisée, à six reprises, à une semaine d'intervalle entre chaque injection ;

Dans le lot 3 (5 Souris), lot témoin, chaque animal a reçu, dans les mêmes conditions, six injections de 0 cm³ 5 d'huile d'Olive simple.

Les expériences sont en cours depuis plus de 8 mois et nous n'avons encore observé aucune tumeur.

QUATRIEME PARTIE

LE PROBLÈME DES SUBSTANCES CANCÉRIGÈNES ENDOGÈNES

CHAPITRE PREMIER

CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES ET TRAVAUX ANTÉRIEURS

Cette quatrième partie de notre travail groupe les recherches tendant à démontrer la production, dans l'organisme même, de substances cancérigènes.

Ces recherches peuvent être poussées dans diverses directions.

1° Elles peuvent tendre à mettre en évidence l'action cancérigène, dans certaines conditions, de composés normaux de l'organisme ;

2° Elles peuvent viser à démontrer la transformation de ces mêmes molécules physiologiques en dérivés cancérigènes, sous l'influence de divers facteurs ;

3° Elles peuvent enfin avoir pour but l'isolement à partir de l'organisme de sujets cancéreux de substances cancérigènes et ce sont évidemment les plus significatives vis-à-vis de l'hypothèse de COOK et KENNAWAY.

I. — L'action cancérigène de composés normaux de l'organisme

Dans ce premier groupe de recherches, il faut citer tout d'abord les résultats obtenus avec un acide biliaire : l'acide désoxycholique qui, comme nous l'avons vu dans la première partie, peut servir de matière première de départ dans la synthèse du méthylcholanthrène. Avec cet acide, introduit en poudre sous la peau dorsale, GHIRON (141) a réussi à provoquer des fibro-sarcomes chez 2 Rats sur 5. Ce résultat a été confirmé par COOK, KENNAWAY et KENNAWAY (81) qui ont injecté à des Souris de l'acide désoxycholique en solution huileuse. La quantité totale de substance injectée en 300 jours était de 70 mg. Les auteurs ont obtenu 3 tumeurs à cellules fusiformes, mais non transplantables, chez 3 Souris sur 10, dont seulement 5 ont vécu plus de 6 mois. Ils ont obtenu, en plus, chez 1 Souris sur 10, provenant d'une souche très sujette au cancer, une tumeur identique, déjà après 155 jours, avec une quantité d'acide biliaire notablement inférieure. Les auteurs ne pensent pas à la transformation de l'acide en méthylcholanthrène, mais envisagent plutôt la possibilité d'autres synthèses, en raison de la longue latence et de la nécessité de nom-

breuses injections, avec des doses relativement élevées. Enfin, Law (231) a injecté de l'acide cholique et du désoxycholate de sodium à des Souris. Ces dérivés étaient dissous dans l'huile d'olive et les animaux ont reçu 3 injections en 3 mois, à raison de 10 mg. d'acide biliaire par injection. Avec le désoxycholate de sodium (20 Souris expérimentées), l'auteur a obtenu un pourcentage de tumeurs pulmonaires très supérieur (80 %) à celui observé (40 %) dans la série témoin (38 Souris) et dans la série à l'acide cholique (30 Souris).

***

Il faut citer ensuite les nombreuses recherches, et particulièrement celles de Lacassagne, sur le rôle de la folliculine ou œstrone comme facteur de cancérisation dans la pathogénie d'un cancer particulier : le cancer de la mamelle.

Rappelons qu'il faut une « prédisposition héréditaire » pour que ce cancer apparaisse. Sur ce facteur héréditaire, des travaux importants ont été effectués par des généticiens comme Murray et Little (269), et surtout par Bittner (34). Ce dernier auteur a pensé à une influence de l'allaitement. Il a expérimenté sur des Souris appartenant à des lignées hautement prédisposées. L'adoption de ces Souris, dès leur naissance, par des nourrices de lignée exempte de cancer fait tomber le taux d'apparition des tumeurs de la mamelle de 83 % à 7 %. Andervont et Mac Eleney (3) ont confirmé les résultats de Bittner à partir d'une autre lignée hautement prédisposée au cancer mammaire. Ils ont précisé certaines des modalités selon lesquelles l'allaitement agit. Ils ont vu, par exemple, que l'adoption des Souris de lignée prédisposée, qui réduit le taux des cancers à presque 0, si les petits sont restés moins de 17 heures avec leur mère, n'a plus qu'une efficacité très faible ou nulle, si les petits ont été laissés à leur mère 48 heures ou davantage. Ce qui déciderait si une Souris fera ou non un cancer de la mamelle à l'âge adulte, c'est donc, apparemment, le lait qu'elle a ingéré dans les deux premiers jours de sa vie.

On s'est naturellement demandé quelle était la nature de l'agent transmis par le lait. On a d'abord pensé à un facteur chimique, mais les recherches effectuées dans ce sens ont donné des résultats négatifs. En particulier, De Ome, Strait et Mac Cawley (91) ont examiné le lait de souches prédisposées ou non au cancer mammaire. Ils en ont tout d'abord préparé des extraits lipidiques dont ils ont étudié le spectre de fluorescence par la lumière ultra-violette. Les spectres obtenus avec les fractions lipidiques du lait de souches prédisposées sont superposables à ceux que donnent les fractions lipidiques du lait de souches non prédisposées. Dans les deux cas, ces spectres n'offrent aucune ressemblance avec ceux obtenus dans les mêmes conditions en examinant des carbures cancérigènes ou des hormones sexuelles. Les auteurs ont montré ensuite que le facteur actif n'était même pas concentré dans les fractions lipidiques. L'idée de la présence d'un virus se présente alors à l'esprit. Mais cette hypothèse

se heurte encore à beaucoup d'objections et, pour l'instant, la question reste entière.

A côté du facteur héréditaire, la stimulation hormonale joue également un très grand rôle dans l'apparition du cancer de la mamelle chez la Souris. Voici les faits :

a) Dans les lignées très sujettes au cancer de la mamelle, seules les femelles développent ce néoplasme ;

b) Si on soustrait les femelles appartenant à des lignées très sujettes au cancer mammaire à toute action œstrogène par la castration pratiquée avant l'entrée en fonction de leurs ovaires, comme l'ont fait, entre autres, Lathrop et Loeb (229), puis Cori (82), ces animaux ne font plus de cancer ;

c) Les mâles sont eux aussi atteints, dans une proportion qui peut aller jusqu'à 100 %, si, issus d'une lignée prédisposée, ils sont soumis à un traitement continu par la folliculine, ainsi que l'ont montré Lacassagne (219), Bonser (40), Burrows (56), Cramer et Horning (85), Gardner, Smith, Allen et Strong (136), Twombly (387), et beaucoup d'autres auteurs.

d) Dans les lignées où le cancer mammaire n'apparaît spontanément chez les femelles que dans une très faible proportion, ce taux normal de cancérisation a pu être élevé jusqu'à plus de 60 %, chez les animaux des deux sexes, sous l'influence d'injection de folliculine, ainsi que l'ont montré, entre autres, Lacassagne (220) et Gardner (137). Ce dernier point est contesté par Butenandt (59), qui, avec ses collaborateurs Kaufmann, Muller et Kröning, a expérimenté sur environ 3.000 Souris avec des doses d'hormone cinquante fois supérieures aux doses physiologiques.

e) On sait que l'adénocarcinome spontané de la mamelle est aussi rare chez le Rat qu'il est fréquent chez la Souris. Or, dans une lignée sélectionnée de Rats dans laquelle, depuis 1934 jusqu'à 1939, aucun cas de cancer spontané n'avait été enregistré sur 2.000 animaux, Geschickter (140) a obtenu, par l'action de substances œstrogènes, un nombre considérable d'adénocarcinomes de la mamelle, aussi bien chez les mâles que chez les femelles.

D'autres tumeurs que celle de la glande mammaire ont pu être obtenues, beaucoup plus rarement il est vrai, chez des Souris soumises à l'action prolongée de substances œstrogènes. C'est ainsi que Lacassagne (221) et Loeb et ses collaborateurs (244) ont obtenu des tumeurs utérines.

En présence de ces faits, certains auteurs ont pu penser que la folliculine intervenait en excitant directement les cellules de la glande mammaire et était ainsi la cause déterminante de la cancérisation. Ils sont même allés jusqu'à supposer une transformation possible de l'hormone en méthylcholanthrène. Comme nous l'avons déjà remarqué, c'est là une

hérésie chimique, car, si une telle transformation peut être logiquement envisagée dans le cas des acides biliaires et du cholestérol, dont le noyau pentagonal est porteur d'une chaîne latérale, il n'en est plus de même avec la folliculine qui ne possède plus cette chaîne latérale.

Il semble bien plutôt, et c'est là la thèse de Butenandt, que la folliculine permet seulement à la « prédisposition héréditaire » au cancer de se manifester, parce qu'elle lui fournit le substratum anatomique nécessaire, en incitant le développement d'une glande mammaire chez le mâle. En effet :

a) On n'a jamais obtenu de cancer cutané, malgré des badigeonnages souvent répétés avec des hormones œstrogènes.

b) Ainsi que l'a montré Lacassagne (222), on n'a jamais pu provoquer jusqu'ici, dans des conditions qui soient absolument probantes, d'adénocarcinome chez des Souris appartenant à des lignées non sujettes au cancer mammaire.

c) L'action favorisante des hormones œstrogènes est liée plus à la propriété œstrogène qu'à la configuration moléculaire des hormones expérimentées. C'est ainsi que des résultats analogues à ceux observés avec la folliculine ont pu être obtenus avec des œstrogènes de synthèse et, en particulier, le triphényléthylène, dans les expériences de Robson et Bonser (310), et le diéthylstilbœstrol, dans les expériences de Lacassagne (223).

Comme contribution personnelle à ce problème des rapports entre le cancer et les hormones œstrogènes, nous avons déterminé le taux de folliculine dans l'urine de sujets cancéreux. La méthode que nous avons utilisée est celle de Jayle, Crépy et Judas (185). Cette méthode est basée sur la réaction colorée de Kober (206) : coloration rouge fournie par les hormones œstrogènes par chauffage avec un mélange en proportions convenable d'acide sulfurique et de phénol. La réaction est simple et la coloration facile à lire, quand on opère avec un échantillon de folliculine cristallisée. Il en va bien différemment quand on effectue le dosage sur un extrait même purifié d'urine, où les pigments interfèrent avec la coloration. Pour pallier cet inconvénient, Jayle et ses collaborateurs ont utilisé l'instabilité de la réaction de Kober, qui s'estompe rapidement quand on opère en présence d'acétone. Ils effectuent la mesure colorimétrique au bout d'un temps rigoureusement constant pour des échantillons de concentrations voisines en substances œstrogènes. Pour obtenir la base de correction, on laisse les tubes séjourner dans l'obscurité pendant quelques heures et on mesure alors l'absorption due à la présence des substances chromogènes interférentes et en particulier aux pigments urinaires et au réactif lui-même. Les mesures colorimétriques sont effectuées avec l'électrophotomètre de Meunier.

Sans nous attarder à examiner ici les imperfections de la méthode, nous voudrions seulement indiquer que les résultats que nous en avons

obtenus n'indiquent aucune corrélation entre le taux de folliculine urinaire et la présence des cancers, non plus qu'avec leur degré de malignité. Chez 78 sujets cancéreux sur l'urine desquels nous avons pratiqué 182 dosages, les chiffres approximatifs obtenus, pour la concentration au litre de folliculine, s'étalent en moyenne entre 80 et 400 γ, ces taux étant évidemment fonction des époques de prélèvement d'urine. *

II. — RECHERCHES SUR LA TRANSFORMATION SOUS L'INFLUENCE DE DIVERS FACTEURS DE MOLÉCULES PHYSIOLOGIQUES EN DÉRIVÉS CANCÉRIGÈNES

A. Bactéries

Nous analyserons tout d'abord les recherches de Druckrey, Richter et Vierthaler (109). Ces auteurs ont préparé des cultures de Colibacilles, isolés des fèces de sujets atteints de cancer du Rectum. Certaines de ces cultures ont été additionnées d'acide désoxycholique ou de déhydronorcholène, carbure qui, on s'en souvient, constitue l'étape intermédiaire entre l'acide désoxycholique et le méthylcholanthrène, dans la synthèse de ce dernier à partir de l'acide biliaire. Chacune des substances était additionnée au milieu de culture (bouillon peptoné), à la dose de 5 mgr. pour 100 cm³. Les cultures étaient abandonnées à l'étuve à 37° pendant vingt-quatre heures. A partir de ces cultures, les auteurs ont préparé des extraits benzéniques qu'ils ont injectés, après évaporation du benzène et mise en solution dans l'huile d'Arachide, à des Rats. La concentration de la solution huileuse était calculée de manière à correspondre par cm³ à 1 mgr. de substance ajoutée au milieu. Chaque animal a reçu 6 injections de 0 cm³ 5, avec une semaine d'intervalle après chaque injection (injection par voie intrapéritonéale).

---

* Avant la correction des épreuves, il nous a été donné d'entendre, au IVe Congrès international de recherches sur le Cancer (Saint-Louis du Missouri, U. S. A., 2-7 septembre 1947), l'exposé d'un travail de Hieger, dans lequel l'auteur anglais a pu mettre en évidence, chez la Souris, une faible activité cancérigène du cholestérol *commercial* injecté en solution dans du lard (9 sarcomes au point d'injection, développés en 14 à 23 mois dans une des séries d'expériences portant au départ sur 104 animaux). Trois hypothèses peuvent, selon l'auteur anglais, expliquer les résultats positifs obtenus :

1° Ou bien, le cholestérol est, par lui-même, un agent cancérigène de faible activité, spécialement en présence d'autres substances lipidiques favorisantes et en l'absence de facteurs inhibiteurs;

2° Ou bien, le cholestérol *commercial* renferme une petite quantité d'un agent encore inconnu, doué d'une haute activité cancérigène, agent qui serait, selon toute vraisemblance, responsable de l'activité cancérigène des fractions riches en cholestérol isolées des humeurs ou des tissus humains (bile; foie; poumon; rein et muscle) ou animaux (cerveau et moelle épinière de Bœuf; beurre de Vache);

3° Ou, enfin, d'autres facteurs et, en particulier, les grandes variations dans la susceptibilité individuelle des Souris mises en expérience, exercent une influence prépondérante.

Plusieurs séries d'expériences ont été effectuées :

1° Série 1, injectée avec un extrait de culture sur milieu simple.

2° Série 2, injectée avec un extrait de culture en présence de déhydronorcholène.

3° Série 3, injectée avec un extrait de culture en présence de déhydronorcholène, mais la culture avait été irradiée, deux heures après l'ensemencement, par la lumière ultra-violette pendant dix minutes.

4° Série 4, injectée avec un extrait de culture en présence d'acide désoxycholique.

5° Séries 5, 6 et 7, injectées avec de l'acide désoxycholique, de l'acide déhydrocholique ou du déhydronorcholène en solution huileuse à la concentration de 1 mgr. par cm^3.

Les résultats obtenus ont été les suivants :

Dans la série 2, sur 16 animaux ayant survécu plus de seize mois, 3 ont fait des sarcomes, apparus au 16e, au 20e et au 21e mois.

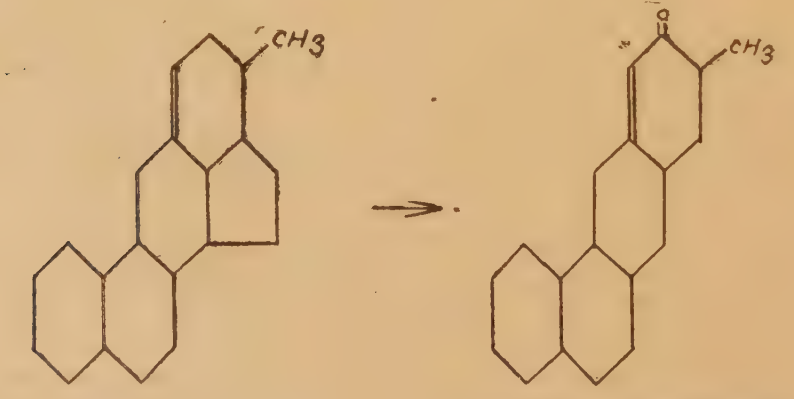
Dans la série 1, 1 sarcome après 19 mois.

Dans la série 3, 1 sarcome et 1 fibrome après 16 mois.

Dans les séries 4, 5, 6 et 7, aucune tumeur ne fut observée.

Les auteurs concluent de ces résultats que, vraisemblablement, chez les sujets cancéreux, des composés normaux de l'organisme comme les acides biliaires peuvent donner naissance à des substances cancérigènes.

En tout cas, il n'y a pas formation de méthylcholanthrène, ainsi que l'ont montré Friedlich et Koyenuma (132) et aussi Butenandt et Dannenberg (60). Ces derniers auteurs ont pu seulement mettre en évidence, d'ailleurs aussi bien dans les milieux sans Colibacille que dans les milieux ensemencés, des dérivés d'oxydation du déhydronorcholène et, en particulier, du 22 oxydéhydronorcholène :

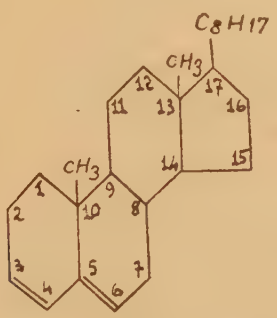


Déhydronorcholène — 22 Oxydéhydronorcholène

P. F. : 157° ; $[\alpha]_D$ = + 81°5 (éther) ; oxime; P. F. : 175-176°, qu'ils ont caractérisé spectrographiquement et aussi par isolement au moyen de la chromatographie sur alumine.

B) Chaleur

Un facteur, qui est très souvent considéré comme susceptible de donner naissance, à partir de substances physiologiques, à des composés cancérigènes, est la chaleur. Nous en avons cité déjà maints exemples à propos de lipides alimentaires ou utilisés comme solvants dans les expériences de cancérisation expérimentale. Nous ajouterons aux faits déjà exposés ceux ayant plus spécialement trait à l'action de la chaleur sur le cholestérol. Rappelons tout d'abord que Kennaway et Sampson (195) avaient obtenu un produit cancérigène par chauffage du cholestérol entre 750 et 800° ; mais il s'agit là d'une température qui n'est atteinte ni dans la préparation des aliments, ni, à plus forte raison, dans les conditions biochimiques. Nous avons vu que Roffo (312) et Waterman (400) attribuaient les propriétés cancérigènes, observées par eux, avec les graisses alimentaires surchauffées, à des transformations portant sur le cholestérol. De fait, Roffo (313), en chauffant du cholestérol à 145-150°, prétend avoir obtenu un goudron cancérigène. Le problème a été abordé, du point de vue chimique, par Veldstra (391), qui a étudié les produits formés dans la pyrolyse à 300-340° sous vide (0 mm. 3) d'un ester du cholestérol (oléate) présent dans les graisses alimentaires. Il a pu isoler le Δ 3,5 cholestadiène; P. F. : 77-78 $[\alpha]_D^{21}$ — 114°, isolé également dans les produits de l'irradiation de l'acétate de cholestérol par Bergmann et Hirshberg (23).



Δ.3.5. Cholestadiène

Waterman (401) a administré *per os* ce carbure à des Souris et obtenu seulement 4 papillomes de l'estomac.

C) Radiations solaires et ultra-violettes

Lacassagne (214) a magnifiquement résumé l'ensemble de nos connais-

sances actuelles sur la production de cancers par les radiations solaires ou ultra-violettes dans une monographie récente. Nous n'y reviendrons pas, mais nous nous arrêterons un instant sur l'hypothèse d'après laquelle de tels cancers cutanés dépendraient de transformations photochimiques subies par le cholestérol ou les composés stéroliques. Nous signalerons les recherches dans lesquelles ont été obtenues des cancers par le cholestérol irradié par les ultra-violets et, en particulier, celles de Roffo (314) et Polettini (289). En revanche, Bergmann, Stavely, Strong et Smith (24), dans leurs expériences avec du cholestérol irradié qu'ils ont appliqué en solution benzénique ou injecté en solution huileuse à la Souris, n'ont obtenu aucune tumeur. Nous rappellerons également les études de Bergmann et Hirshberg (23), qui, comme nous l'avons vu à propos de l'action de la chaleur, ont isolé, dans les produits de l'irradiation ultraviolette du cholestérol sous forme d'ester acétique, le Δ 3.5 cholestadiène. Il faut citer encore les études de Skau et Bergmann (358) et celles de Butenandt et Kudfuss (61) sur les transformations photochimiques du Δ 2.4 cholestadiène, obtenu par chauffage du cholestérol avec de l'alumine à 240° suivant Stavely et Bergmann (361). Ils en ont isolé un peroxyde P. F. : 147; $[\alpha]_D^{22} = + 140° 5$ ($CH\ CL_3$). Le Δ 2.4 cholestadiène et son peroxyde ont été essayés, du point de vue cancérigène, par Friedrich-Freksa (133), qui n'a pas obtenu de résultats positifs et a seulement noté une action irritante sur la peau (Souris). Enfin, Windaus, Bursian et Riemann (413) ont irradié par les U. V. du cholestérol pur en substance et ils ont soumis le produit ainsi irradié au fractionnement chromatographique et chimique. Ils ont pu isoler différents oxycholestérols, de formule globale $C_{27}\,H_{46}\,O_2$, dont la majeure partie est constituée par de l'α 7 oxycholestérol. Ils ont isolé également du Δ 4,5 cholesten 3,6-diol, mais ils n'ont pas trouvé trace des carbures phénanthréniques, dont Roffo (332) avait envisagé la formation. Signalons, pour terminer, qu'en 1943, l'auteur américain Kirby (202) n'a pu obtenir de tumeurs stomacales chez le Rat, auquel il faisait ingérer du cholestérol chauffé à 270°-300°. Ses résultats s'opposent nettement à ceux de Roffo.

D) Rayons X

C'est un fait classique que les rayons X, comme les radiations émises par le Radium, peuvent, à doses suffisantes, provoquer la cancérisation (Lacassagne) (214). Pour expliquer cette action, on peut penser à une transformation en substances cancérigènes, sous l'influence de ces agents physiques, de composés biologiques existants dans l'organisme ou introduits par l'alimentation. Le composé dont le nom vient immédiatement à l'esprit est, là encore, le cholestérol.

Roffo (315) a étudié, en 1925, l'action des rayons X sur ce composé dissous dans le chloroforme ou dans le benzène. Il signale l'obtention d'un produit oléagineux vert sombre exhalant une odeur aromatique et note

la disparition de la réaction de LIEBERMANN sur le produit qu'on peut obtenir par évaporation des solvants après irradiation. Il n'a pas procédé, à notre connaissance, à des essais biologiques. DOGNON (105), puis HIEGER (166) ont montré que les solvants chlorés de la série grasse, et en particulier le chloroforme et le tétrachlorure de carbone sont décomposés par les rayons X avec production de chlore qui réagit ensuite sur le cholestérol en donnant des produits de points de fusion très inférieurs à celui de l'alcool terpénique. Cette considération enlève toute valeur aux résultats obtenus par ROFFO.

Cependant, en 1937, BURROWS et MAYNEORD (57) publièrent, dans une courte note, que l'injection à la Souris d'une solution de cholestérol dans du saindoux, après irradiation aux rayons X (doses utilisées : 60.000 r. et 110.000 r.), conduit à la production de sarcomes fuso-cellulaires chez 10 % des animaux mis en expérience (20 Souris).

Ce résultat était d'importance, car, si sa vérification s'avérait positive, le mécanisme des cancers par rayons X se trouvait ramené à un mécanisme chimique. Nous apporterons notre contribution à ce problème en étudiant l'action des rayons X sur le cholestérol et ce sera le deuxième chapitre de la quatrième partie de ce travail.

III. — ESSAIS D'ISOLEMENT DE SUBSTANCES CANCÉRIGÈNES A PARTIR DE L'ORGANISME CANCÉREUX

Si l'hypothèse de COOK et KENNAWAY est juste, on doit évidemment pouvoir extraire de l'organisme cancéreux des produits cancérigènes.

Les premiers essais dans cette voie qui aient donné lieu à publication sont ceux de FRANICEVIC et STANOYEVITCH en 1936 (129). Ces auteurs injectèrent du liquide d'ascite et de l'exsudat de tumeurs de sujets cancéreux à des Souris, mais ils n'obtinrent pas de cancers. LINDENBERG (241) a bien observé des adénomes de l'épididyme en injectant au Lapin et au Cobaye du sérum de cancéreux, mais pas de tumeurs malignes; JOBLING, SPROUL et STEVENS (187), étudiant le sarcome de ROUS, prétendirent que l'agent transmissible pouvait être concentré dans un extrait lipidique, mais leurs résultats positifs n'ont pas été confirmés par POLARD et AMIÈS (290).

Le premier résultat positif absolument indiscutable a été obtenu par SCHABAD (336), de l'Institut de Médecine expérimentale de Leningrad, en 1937. Cet auteur introduisit sous la peau de la cuisse gauche de 10 Souris, à peu près une fois par semaine, et en tout 8 fois, 0 cm³ 3 d'un extrait benzénique total (273) provenant du foie d'une femme morte d'un cancer de l'estomac avec de nombreuses métastases, bien que le foie lui-même en soit exempt. Sur 7 Souris survivantes, il observa, huit à neuf mois après le début de l'expérience, chez 3 animaux (2 mâles et 1 femelle), au voisinage du point d'injection, deux sarcomes à cellules fusiformes et

un épithélioma mammaire. Six des Souris présentèrent des adénomes du poumon ou des glandes sébacées, 3 des tumeurs malignes diverses (foie, glandes mammaires, estomac) éloignées du point d'injection. Les sarcomes purent être greffés en série.

On pouvait adresser deux reproches aux expériences de SCHABAD :

1° Elles ont porté sur un trop petit nombre de Souris;

2° Elles n'ont pas été contrôlées par des séries d'essais témoins.

A l'époque où parut la première publication de SCHABAD, nous avions déjà des recherches en cours sur le problème des substances cancérigènes endogènes. Nous les avons continuées jusqu'à maintenant et leur exposé fera l'objet de plusieurs chapitres de cette quatrième partie.

CHAPITRE II

RECHERCHES SUR L'ACTION CANCÉRIGÈNE ÉVENTUELLE DU CHOLESTÉROL IRRADIÉ PAR LES RAYONS X

Nous avons rappelé, dans les considérations générales qui ont fait l'objet du premier chapitre, les expériences de BURROWS et MAYNEORD (57), dans lesquelles ces auteurs ont montré que l'injection à la Souris d'une solution de cholestérol dans du saindoux, après irradiation aux rayons X, conduit à la production de sarcomes chez 10 % des animaux en expérience.

Etant donné l'importance du problème, il nous a semblé intéressant de reprendre ces expériences, en opérant avec du cholestérol dissous, non plus dans un solvant lipidique qui peut lui-même subir des modifications sous l'influence de l'irradiation, mais dans un solvant organique inaltérable dans ces conditions. Cette considération nous a conduit à éliminer comme solvants le chloroforme et le tétrachlorure de carbone, et, d'une façon générale, les solvants chlorés de la série grasse qui, ainsi que l'ont montré DOGNON (105), puis HIEGER (166), sont décomposés par les rayons X, avec production de chlore libre susceptible de réagir ensuite sur le cholestérol.

Le solvant utilisé a été le benzène, spécialement purifié par ébullition au réfrigérant à reflux pendant quatre à cinq heures avec 1 % de chlorure d'aluminium anhydre (élimination totale des composés thiophéniques). On lave ensuite avec une solution aqueuse de soude à 10 %, puis avec de l'eau distillée jusqu'à disparition de toute trace d'alcalinité; on procède enfin à une distillation sur sodium en fil et on conserve le produit anhydre obtenu sur sodium.

Le cholestérol utilisé était un cholestérol très pur que nous avons obtenu par saponification du dérivé acétylé, puis fait cristalliser d'abord dans l'éther anhydre et ensuite, à cinq reprises, dans l'alcool éthylique absolu et, enfin, une dernière fois, dans l'éther anhydre. C'est d'ailleurs ce cholestérol dont nous avons, avec Mlle THEODORESCO (384), déterminé le spectre d'absorption dans l'ultra-violet compris entre 2.223 et 1.969$^{A}_{\theta}$. Le point de fusion instantanée au bloc Maquenne, du cholestérol ainsi purifié était de 146° 5-147°. Son pouvoir rotatoire en solution à 2 % dans le chloroforme et à la température de 20° C. était $[\alpha]^{20}_{0} = -38°$.

Nous avons préparé une solution benzénique à la concentration de 5 % (5 gr. de cholestérol pour 100 cm³ de benzène). Nous avons soumis cette solution à l'irradiation par les rayons X émis par un tube démontable de HOLLWECK avec anticathode en molybdène (longueur d'onde efficace = 0,95 A), tube alimenté sous 33,5 kilovolts et 30 mA. La dose employée a été de 100.000 r., ce qui correspondait à une irradiation de vingt-deux minutes. Nous rappellerons, pour fixer les idées, que les doses thérapeutiques pratiquement utilisées sont de l'ordre de 6.000 r. en radiothérapie, et de 10.000 r. en curiethérapie, et que BURROWS et MAYNEORD ont effectué leurs expériences avec des doses de 60.000 r. et de 110.000 r.

L'irradiation a été pratiquée dans un petit cristallisoir très aplati du type préconisé par FRILEY (134) pour l'étude des irradiations de substances chimiques. Ce dispositif permet une répartition régulière de l'irradiation sur l'ensemble de la solution étalée en couche très mince (4 mm. d'épaisseur), à 16 cm. de distance du foyer d'émission .

Nous avons ensuite chassé le solvant sous pression réduite en atmosphère d'azote, et le cholestérol ainsi irradié a été mis en suspension dans l'huile d'Olive neutralisée et stérilisée à la concentration de 20 %; 1 cm³ de suspension huileuse finale renfermait 0 gr. 20 de cholestérol irradié.

Pour éviter tout chauffage, nous avons préparé cette suspension dans des conditions rigoureuses d'asepsie : flambage des mortiers, pilons, flacons, etc.

Dans les mêmes conditions, nous avons dissous 5 grammes de cholestérol dans 100 cm³ de benzène, chassé ensuite le solvant sous pression réduite en atmosphère d'azote et mis le cholestérol récupéré en suspension dans l'huile d'Olive neutralisée et stérilisée à la concentration de 20 %.

Le matériel animal utilisé dans notre expérimentation était constitué par 60 Souris âgées de quatre mois, par moitié mâles et femelles, et provenant du même élevage. Nous avons réparti les animaux en trois lots de 20.

Dans le lot n° 1, chaque animal a reçu, en injection sous-cutanée, dans la région dorsale, 1 cm³ de solution huileuse de cholestérol irradié, soit 0 gr. 20 du produit.

Dans le lot n° 2, chaque animal a reçu, dans les mêmes conditions, 1 cm³ de solution huileuse de cholestérol non irradié, soit également 0 gr. 20 du produit.

Dans le lot n° 3, chaque animal a reçu, dans les mêmes conditions, 1 cm³ d'huile d'Olive neutralisée et stérilisée.

Voici les résultats que nous avons obtenus :

Tout d'abord, dans les premiers jours qui suivirent le début de l'expérience, alors que tous les animaux du lot témoin (n° 3) se sont maintenus en parfaite santé, beaucoup d'animaux des lots 1 et 2 ont présenté des nécroses dans les régions voisines du point d'injection et un certain nombre en sont morts.

Dans le lot n° 1, un animal femelle, mort deux mois et demi après le début de l'expérience, a montré une tumeur étendue siégeant au thorax, qu'elle remplissait presque entièrement. Histologiquement, il s'agissait d'un lymphosarcome, type de tumeur dont on sait qu'elle ne peut apparaître spontanément (figure 3).

Dans le lot n° 2, nous n'avons observé aucune tumeur. 1 Souris femelle, morte soixante-neuf jours après le début de l'expérience, a bien présenté une sorte de tumeur, mais il s'agissait d'un amas d'huile non résorbée (huilome), ayant entraîné une réaction giganto-cellulaire.

Dans le lot n° 3, témoin, nous avons noté :

1° Chez une Souris mâle, morte dix mois et demi après le début de l'expérience, une tumeur cutanée de 2 cm. sur 3, siégeant au niveau de la région thoracique ventrale supérieure droite. Histologiquement, il s'agissait d'un papillome hyperkératosique cutané, c'est-à-dire d'une tumeur bénigne.

2° Chez une Souris femelle, morte seize mois après le début de l'expérience, macroscopiquement, une tumeur blanchâtre, de 1 cm. de diamètre et 3 mm. de hauteur environ, siégeant sous la peau, dans la région postéro-latérale droite et s'étendant presque jusqu'à la cavité péritonéale, latéralement par rapport au tractus génital. Histologiquement, cette tumeur s'est révélée comme un sarcome fuso-cellulaire. Au niveau du foie qui, macroscopiquement, présentait des zones blanchâtres, il existait des lésions inflammatoires importantes.

Nous tenons à remarquer que c'est la première fois, malgré une expérimentation déjà longue et ayant porté sur de nombreux animaux, que nous avons observé un cancer chez des animaux injectés avec de l'huile d'Olive.

En conclusion de cette série d'expériences, il nous paraît légitime d'affirmer que le cholestérol irradié par les rayons X ne possède pas de propriétés cancérigènes. D'ailleurs, l'examen chimique (réactions de coloration et de précipitation) et physique (P. F., pouvoir rotatoire, spectre

dans l'ultra-violet) ne nous a, à notre grande surprise, révélé aucune différence entre le cholestérol irradié et le cholestérol pur dont nous étions partis.

Il nous paraît également intéressant d'opposer nos résultats négatifs avec le cholestérol *purifié* aux résultats positifs obtenus tout récemment par HIEGER avec du cholestérol *commercial*, injecté à la Souris en solution dans du lard (9 sarcomes au point d'injection, développés en 14 à 23 mois, dans une des séries d'expériences portant au départ sur 104 animaux). Si la susceptibilité individuelle des animaux n'est pas en cause, cela tendrait à démontrer la présence, dans le cholestérol *commercial*, d'une ou plusieurs impuretés fortement cancérigènes.

CHAPITRE III

NOS RECHERCHES PERSONNELLES SUR L'ACTION CANCÉRIGÈNE des INSAPONIFIABLES DE FOIES DE SUJETS CANCÉREUX

Nous avons dit, dans le premier chapitre des considérations générales, que, lorsque parut la première publication de l'auteur russe SCHABAD (1937), nous avions déjà des recherches en cours en vue d'isoler de l'organisme cancéreux des fractions cancérigènes. Comme SCHABAD, c'est le foie qui avait retenu notre attention, en raison de son rôle bien connu dans le métabolisme du cholestérol. Mais, au lieu d'expérimenter avec les lipides totaux de l'organe, nous avons étudié seulement la fraction insaponifiable de ces lipides, où devaient se trouver concentrés les composés analogues aux carbures cancérigènes éventuellement présents. En même temps, nous éliminions ainsi le rôle possible des lipides hétérogènes.

PRÉPARATION DES INSAPONIFIABLES

Nous avons préparé simultanément des insaponifiables de foies de sujets cancéreux et des insaponifiables de foies de sujets non cancéreux.

Les foies étaient prélevés le plus tôt possible après la mort, sans jamais dépasser six heures d'attente, pour éviter, le plus possible, l'autolyse *post mortem*. Ils étaient privés de la capsule entourant l'organe et de la vésicule biliaire, puis lavés avec un peu d'eau distillée pour éliminer le sang. Ils étaient alors pulpés et la pulpe était desséchée à l'étuve en élevant progresivement la température de 30 à 95°, sans jamais atteindre 100°. Lorsque la dessication était suffisante, ce qui demandait seize heures environ pour une foie de 1 kg., la pulpe était retirée de l'étuve et, après refroidissement, soumise à l'extraction par trois fois son poids de benzène pur anhydre (préparé, comme nous l'avons vu à propos des expé-

riences d'irradiation du cholestérol) au réfrigérant à reflux pendant douze heures. L'extractum benzénique était recueilli et il était procédé à un nouvel épuisement du résidu avec la même proportion de benzène et dans les mêmes conditions que précédemment. Les liqueurs benzéniques étaient alors réunies et la plus grande partie du benzène chassée par distillation sous pression réduite à basse température. Nous terminions l'évaporation au bain-marie et obtenions ainsi un extrait de consistance butyreuse couleur brun-jaunâtre.

Cet extrait lipidique était ensuite saponifié suivant une technique dérivée de celle de Lemeland (236) pour le dosage de l'insaponifiable des extraits lipidiques. A 50 gr. d'extrait, on ajoute 300 cm³ sensiblement 2 N de potasse dans l'alcool à 95°. On porte à l'ébullition, que l'on maintient deux heures au réfrigérant à reflux. On ajoute 480 cm³ d'acide chlorhydrique approximativement normal; 314 cm³ d'alcool à 95° et 105 cm³ d'eau distillée, ce qui donne un liquide de titre alcoolique d'environ 50° et d'une alcalinité voisine de N/10. Le liquide est chauffé à nouveau au réfrigérant à reflux, de façon à bien dissoudre tous les acides gras. Après refroidissement, on épuise à plusieurs reprises par un grand excès d'éther de pétrole. Ce solvant, comme le benzène, était soigneusement purifié : traitement à plusieurs reprises par 10 % d'acide sulfurique concentré, avec contact prolongé; lavages à l'eau distillée; agitation pendant plusieurs jours avec un demi-volume de solution saturée de permanganate de potassium; nouveaux lavages à l'eau distillée; dessiccation sur chlorure de calcium anhydre et, enfin, distillation. L'éther de pétrole que nous avons utilisé était un éther de pétrole léger, dont le point d'ébullition allait de 30 à 60°.

Dans la liqueur éthéro-pétrolique obtenue, on chasse le solvant par distillation en s'aidant du vide et en opérant en atmosphère d'azote. Les insaponifiables obtenus sont de couleur jaunâtre; nous les conservons dans le vide pour prévenir toute altération par oxydation.

Nous avons traité, par cette méthode, dans une première série d'expériences :

1° Deux foies de sujets cancéreux : l'un (1 kg. 110) prélevé sur un Homme de 59 ans, atteint d'un épithelioma de la cavité buccale, a fourni 31 grammes d'extrait lipidique et 4 grs 05 d'insaponifiable ; l'autre (1 kg. 580), prélevé sur une Femme de 71 ans, atteinte d'un épithelioma vulvo-vaginal, a fourni 105 grs d'extrait lipidique (dégénérescence graisseuse du foie) et seulement 3 grs 14 d'insaponifiable.

Aucun de ces deux foies ne présentait de métastases.

2° Deux foies de sujets non cancéreux : l'un, prélevé sur une Femme de 71 ans (730 grs), a fourni 25 grs d'extrait lipidique et 2 grs 74 d'insaponifiable; l'autre, prélevé sur un Homme de 67 ans (1 kg 750), a fourni 31 grs d'extrait lipidique et 4 grs 68 d'insaponifiable.

ESSAIS SUR L'ANIMAL DES INSAPONIFIABLES OBTENUS

Première série d'expériences

A. — *Expérimentation sur la Souris.*

Nous avons utilisé 75 Souris adultes, âgées de trois à quatre mois, provenant d'un même élevage, mais non d'une souche sélectionnée. Les animaux ont été répartis en trois lots de 25, comprenant chacun 10 mâles et 15 femelles. Ils ont été injectés chaque semaine, pendant deux mois, sous la peau du dos, avec 0 cm³ 3 d'une solution huileuse différente selon le lot; au total, 8 injections, soit 2 cm³ 4 de solution huileuse.

Le lot 1 a reçu la solution huileuse d'insaponifiable de foies de sujets cancéreux. Cette solution était à la concentration de 5 % dans l'huile d'Olive neutralisée, concentration que nous avons adoptée, en nous basant sur le pourcentage moyen d'insaponifiable dans nos extraits lipidiques.

Pour effectuer la dissolution, il faut commencer par dissoudre l'insaponifiable dans 10 à 20 cm³ d'éther, puis ajouter cette solution éthérée à 100 cm³ d'huile d'Olive. L'éther est ensuite chassé au bain-marie et la solution huileuse répartie en petits flacons préalablement stérilisés à 180° pendant vingt minutes.

La quantité moyenne d'insaponifiable injectée à chaque animal était de 0 gr. 136.

Le lot 2 a reçu la solution huileuse d'insaponifiable de foies de sujets non cancéreux, préparée à la même concentration et dans les mêmes conditions que la solution d'insaponifiable de foies de cancéreux.

Le lot 3, témoin, a reçu seulement l'huile d'Olive utilisée comme solvant.

Voici les résultats que nous avons obtenus :

Chez les animaux en expérience, nous avons observé trois types de lésions différentes :

a) *Des tumeurs kystiques sous-cutanées ;*

b) *Des sarcomes sous-cutanés;*

c) *Des néoplasies diverses.*

1° *Les tumeurs kystiques sous-cutanées* étaient des tumeurs d'apparition relativement précoce, se manifestant le plus souvent vers le cinquième ou le sixième mois, mais pouvant survenir jusqu'au douzième mois. Elles se développaient assez vite et persistaient longtemps, même pendant une période de vingt mois, jusqu'à la mort de l'animal. Rarement leur régression a pu être constatée.

Leur nombre était variable selon la série expérimentale. On en a noté le plus grand nombre dans la série 1, injectée avec l'extrait de foie de sujets cancéreux : 12 cas, dont 2 seulement chez les mâles. Il n'y avait

que 5 cas, dont 1 seul chez un mâle, dans la série 2, injectée avec l'insaponifiable de foie de sujets non cancéreux, et aucun cas dans la série 3 témoin.

Ces tumeurs, un peu tendues, fluctuantes au palper, étaient constituées par de véritables kystes (figure 4), contenant un liquide le plus souvent épais, brun-rougeâtre ou même de teinte chocolat. Histologiquement, ce sont de simples kystes hémorragiques développés au niveau d'un huilome. Au stade de début, on voit un tissu conjonctif jeune qui entoure des cavités contenant des éléments sanguins et présente une infiltration légère par des éléments réactionnels inflammatoires. Ultérieurement, le kyste s'est développé, la paroi forme une coque fibreuse avec histiocytes en surcharge lipidique et quelques dépôts calcaires avec réaction gigantocellulaire; le contenu du kyste est constitué par des tractus fibrineux avec des vestiges de globules rouges. En cas de régression, on peut observer une réaction à éléments plasmodiaux avec surcharge calcaire considérable.

2° *Les sarcomes sous-cutanés* sont d'apparition plus tardive, du douzième au vingtième mois. Ils évoluent assez rapidement en un à deux mois, entraînant la mort de l'animal. Le fait important, c'est leur présence uniquement dans la série 1, injectée avec l'insaponifiable de foie de sujets cancéreux. Pour juger de leur fréquence, il faut éliminer les animaux morts dans la première année, puisque la première tumeur n'est apparue qu'au début de la deuxième année. Or, à cette date, vivaient encore 20 Souris dans la série 1, 20 dans la série 2 et 15 dans la série 3.

Le nombre des sarcomes observés, tous dans la série 1, a été de 6, dont un seul sur 12 femelles, alors qu'il y eut 5 cas sur les 8 mâles survivants.

Ces tumeurs siégeaient le plus souvent dans la région dorsale, mais parfois empiétaient sur la région thoracique ou abdominale antérieure. Elles peuvent donc paraître ne s'être pas toujours développées exactement dans la zone injectée. En réalité, nous avons constaté que la solution huileuse diffuse très loin de la zone d'injection, même dans la région ventrale pour une injection dorsale, et nous avons souvent trouvé, à l'autopsie des animaux, la trace de l'huile injectée sous forme de petits nodules crétacés sous la peau de l'abdomen ou dans la région thoracique antérieure.

Les sarcomes se présentaient macroscopiquement comme des tumeurs pouvant atteindre le volume d'une noix, plus ou moins aplaties, envahissant les plans sous-jacents (paroi thoracique, couche musculaire) et produisant parfois une ulcération de la peau (figure 4). Elles étaient constituées par un tissu homogène, blanc nacré, de consistance ferme. Nous n'avons pas observé de métastases.

Histologiquement, ces tumeurs, de structure très semblable, étaient des sarcomes fusiformes typiques, analogues à ceux que l'on obtient avec les carbures cancérigènes. La transplantation a été essayée pour trois d'entre elles avec succès; deux sont actuellement au dixième passage.

Ces sarcomes se sont toujours développés indépendamment des kystes hémorragiques; ils peuvent apparaître simultanément sur le même animal. Dans aucun cas, nous n'avons pu saisir leur développement aux dépens de la formation kystique ou d'un petit huilome sous-cutané, comme SCHABAD l'avait constaté pour une de ses tumeurs.

Les protocoles d'autopsie des 6 sarcomes sous-cutanés ont été indiqués par ailleurs (333) et, pour ne pas surcharger notre travail, nous n'y reviendrons pas.

3° *Les néoplasies variées* ont été constatées chez les animaux, en particulier dans la série 1 (foies de sujets cancéreux).

Dans cette série 1, on a observé 6 cas de néoplasies :

a) Chez une Souris femelle, un épithélioma cutané du mamelon et des adénomes pulmonaires.

b) Chez une Souris mâle, un épithélioma pulmonaire envahissant avec foyers métastatiques.

c) Chez une Souris femelle, un épithélioma atypique, d'origine probablement pancréatique, avec métastase rénale.

d) Chez une Souris femelle, un sarcome de la trompe et un réticulo-sarcome hépatique;

e) Chez une Souris femelle, une réticulo-sarcomatose du foie;

f) Chez une Souris mâle, également une réticulo-sarcomatose du foie.

Dans la série 2 (foies de sujets non cancéreux), on trouve aussi 3 cas de néoplasies hépatiques :

a) Chez une Souris femelle, une réticulo-sarcomatose du foie.

b) Chez une Souris femelle, une réticulo-granulomatose du foie, avec un début de réticulo-sarcome.

c) Chez une Souris femelle, une réticulo-endothéliose du foie, avec quelques foyers dans la rate, le rein, le poumon, les ganglions.

Dans la série 3, témoin, nous n'avons observé qu'un seul cas de réticulo-granulomatose.

Voici les conclusions que nous avons posées à la suite de cette première série d'expériences sur la Souris :

1° *La constatation la plus importante est l'apparition chez les Souris injectées avec l'insaponifiable de foie de sujets cancéreux, de sarcomes chez* 6 *souris sur* 20, *soit une proportion de* 30 %. *Ce pourcentage est analogue à celui que l'on obtient en utilisant des solutions faibles, au* 1/10.000e, *de benzopyrène* (20 %) *ou de méthylcholanthrène* (37 %).

Il faut donc admettre l'existence d'une ou plusieurs substances cancérigènes dans l'insaponifiable de foies de sujets cancéreux, à moins d'invoquer des phénomènes de coïncidence dus au hasard pur.

Or, le sarcome fuso-cellulaire spontané de la Souris est rare, moins de

1 % dans les statistiques les plus étendues; d'ailleurs, les chercheurs du laboratoire de Médecine expérimentale de l'Institut du Cancer n'en ont pas observé un seul cas sur plus de 3.000 Souris autopsiées.

Enfin, dans nos deux séries témoins, nous n'avons obtenu aucun sarcome. On ne saurait donc invoquer la présence du solvant huileux, l'irritation chronique locale, ou l'irritation mécanique produite par les piqûres, comme Lacassagne (224) le suggère, après d'autres auteurs et, en particulier, Nishiyama (278), Nonaka (279), Takizawa (376), Reding (301), Suntzeff, Babcock et Loeb (372), qui ont expérimenté avec diverses substances anodines (glucose, protéines, ClH).

La nature sarcomateuse de ces tumeurs sous-cutanées ne fait aucun doute, puisque leur aspect anatomo-pathologique et leur caractère de transplantabilité sont identiques à ceux des tumeurs obtenues par les substances chimiques cancérigènes de synthèse.

2° La constatation de néoplasies diverses dans les séries ayant reçu des insaponifiables de foies, qu'ils soient obtenus ou non à partir de sujets cancéreux, tend à prouver que ces insaponifiables auraient une action favorisante sur le développement de ces tumeurs variées.

Cette action est plus spécialement nette dans le cas des lésions de réticulo-sarcomatose du foie. On constate la gradation des lésions selon la série : dans la série 3, avec l'huile seule, on observe seulement un cas de réticulo-granulomatose, simple processus inflammatoire; alors que, dans la série 2, avec l'insaponifiable de foie normal, on passe à la réticulo-endothéliose pour aboutir à la réticulo-sarcomatose véritable que l'on retrouve dans les trois cas de la série 1, avec l'insaponifiable de foies de sujets cancéreux.

Ces faits sont à rapprocher de ceux signalés par Reding (359) chez des Souris injectées longuement avec des substances protéiques variées. En particulier, avec un extrait non déprotéinisé de foie, il a observé une prolifération de la trame réticulo-endothéliale du foie avec des formes intéressantes de transition entre l'hépatite diffuse et la malignité.

3° Enfin, l'apparition des kystes hématiques dans les seules séries injectées avec de l'insaponifiable hépatique tend à prouver qu'on doit rattacher leur production à l'influence de cet insaponifiable.

Ainsi, nos expériences confirment, sur un plus grand nombre d'animaux et dans des conditions plus strictes, les résultats obtenus par Schabad, concernant l'action cancérigène d'un extrait benzénique de foie de sujets cancéreux. Elles précisent en outre que cette action n'est pas exercée par un extrait de foie de sujets non cancéreux et montrent que c'est dans l'insaponifiable que se trouvent les fractions actives.

Il faut signaler que le temps d'incubation, nécessaire à l'apparition des sarcomes, est nettement plus élevé avec l'insaponifiable qu'avec l'extrait benzénique total (douze à vingt mois au lieu de huit à neuf mois). En outre, nous n'avons pas retrouvé la fréquence de tumeurs bénignes

(adénomes pulmonaires et adénomes des glandes sébacées) signalée par SCHABAD ; un seul de nos animaux a présenté des adénomes pulmonaires. Par contre, nous avons observé que 5 de nos animaux avaient succombé à des cancers de sièges variés (mamelle, poumon, trompe, pancréas, foie).

En ce qui concerne les tumeurs du foie, qui étaient dans les trois cas des réticulo-sarcomatoses, nous devons souligner que trois autres cas comparables ont été observés dans la série injectée avec l'insaponifiable de foie de sujets non cancéreux.

Il n'est donc pas nécessaire de faire intervenir une substance provenant de l'organisme cancéreux et contenue dans l'extrait pour expliquer la production de cette néoplasie hépatique. Ce serait tout au plus l'insaponifiable hépatique par lui-même, sinon l'huile utilisée comme solvant, qui pourrait être considéré comme l'agent déterminant.

En résumé, il semble logique d'admettre l'existence d'un ou plusieurs facteurs cancérigènes dans l'insaponifiable obtenu en partant de foies de sujets cancéreux humains.

B. Expérimentation sur le Rat

Nous avons expérimenté sur 30 Rats, âgés de 2 mois, par moitié mâles et femelles, et nous les avons répartis en trois lots :

Dans le lot 1 (10 Rats), chaque animal a reçu, par voie sous-cutanée, 1 cm³, en une seule injection, de solution d'insaponifiable de foies de sujets cancéreux dans l'huile d'Olive neutralisée, à la concentration de 2 gr. 50 d'insaponifiable pour 10 cm³ de solution finale (Quantité d'insaponifiable injectée : 0 gr. 25.)

Dans le lot 2 (10 Rats), chaque animal a reçu 1 cm³ de solution huileuse d'insaponifiable de foies de sujets non cancéreux, à la même concentration que pour le lot 1.

Dans le lot 3 (10 Rats), chaque animal a reçu 1 cm³ d'huile d'Olive neutralisée utilisée comme solvant.

Dans aucune des trois séries, et malgré que les animaux aient vécu assez longtemps, il n'a été obtenu de tumeurs.

DEUXIÈME SÉRIE D'EXPÉRIENCES AVEC LES INSAPONIFIABLES

Décidés à poursuivre le fractionnement de nos insaponifiables et ayant eu connaissance d'autre part, des résultats négatifs obtenus par d'autres auteurs et, en particulier, BUTENANDT et ses collaborateurs (59) et aussi GUMMEL (149), nous avons préparé de nouvelles quantités d'insaponifiables de foies de sujets cancéreux et de sujets non cancéreux. Dans le cas des sujets cancéreux, nous avons utilisé, cette fois-ci, des foies sans métastases et des foies avec métastases.

Les foies de sujets cancéreux sans métastases hépatiques furent prélevés sur trois Hommes et 2 Femmes atteints de cancers divers (épithélioma glandulaire cylindrique du Rectum chez un Homme de 64 ans, épithélioma malpighien parakératosique de l'Œsophage chez un Homme de 46 ans, métastase ganglionnaire cervicale d'un épithélioma malpighien d'origine œsophagique probable chez un Homme de 65 ans, cancer très atypique du Sein chez une Femme de 69 ans, épithélioma glandulaire du Sein chez une Femme de 83 ans).

Ceux des sujets cancéreux à métastases hépatiques furent prélevés sur cinq Femmes atteintes également de cancers divers (cancer de l'Utérus chez une Femme de 48 ans, épithélioma de l'Estomac chez une Femme de 84 ans, épithélioma glandulaire du Sein chez une Femme de 52 ans, épithélioma glandulaire cylindrique de l'Estomac chez une Femme de 58 ans, épithélioma malpighien kératinisant de la Face chez une Femme de 71 ans).

Enfin, les foies normaux ont été prélevés sur huit Femmes et quatre Hommes (78 ans, 76 ans, 89 ans, 79 ans, 87 ans, 73 ans, 84 ans, 90 ans, 77 ans, 17 ans, 58 ans, 66 ans).

Tous ces foies ont été recueillis et traités dans les conditions que nous avons antérieurement décrites: pulpation de l'organe débarrassé de la vésicule biliaire, dessiccation de la pulpe à une température ne dépassant pas 100°, extraction des lipides par épuisement de la pulpe desséchée avec le benzène à chaud, saponification des extraits lipidiques par la potasse alcoolique et extraction des insaponifiables par l'éther de pétrole dans des conditions très précises d'alcalinité et de titre alcoolique.

Les poids d'insaponifiables obtenus ont été les suivants : 31 grs à partir de 370 grs d'extrait lipidique de foies de sujets cancéreux sans métastases hépatiques ; 124 grs à partir de 1.090 grs d'extrait lipidique de foies de sujets cancéreux avec métastases hépatiques ; 68 grs 50 à partir de 580 grs d'extrait lipidique de foies normaux.

Ces insaponifiables, de couleur jaunâtre ou brun jaunâtre, ont été conservés dans le vide pour prévenir toute altération par oxydation.

Pour les injecter à l'animal, nous les avons mis en solution dans l'huile d'Olive neutralisée pour injections de la Pharmacopée française. Nous avons adopté une concentration beaucoup plus forte (quatre fois environ) que dans notre première série d'expériences, de façon à réduire les injections à une seule et à éliminer ainsi absolument la cause d'erreur due à la répétition des piqûres ; 4 grs d'insaponifiable ont été dissous dans 20 à 30 cm^3 d'éther de pétrole, puis la solution obtenue a été mélangée à 20 cm^3 d'huile d'Olive. L'éther de pétrole a été ensuite chassé au bain-marie et les solutions huileuses renfermant sensiblement 0 gr. 20 d'insaponifiable par centimètre cube réparties en petits flacons préalablement stérilisés à 180° pendant vingt minutes.

Comme animaux d'expériences, nous avons utilisé 80 Souris, âgées de deux mois et demi, mâles et femelles par moitié, et provenant d'un même élevage.

Les animaux ont été répartis en quatre lots identiques de 20 Souris :

Dans le lot 1, chaque animal a reçu une seule injection sous la peau de la région dorsale, de 1 cm^3 de solution huileuse d'insaponifiable de foies de sujets cancéreux sans métastases hépatiques.

Dans le lot 2, chaque animal a reçu une seule injection, dans les mêmes conditions, de 1 cm^3 de solution huileuse d'insaponifiable de foies de sujets cancéreux avec métastases hépatiques.

Dans le lot 3, chaque animal a reçu, dans les mêmes conditions, 1 cm^3 de solution huileuse d'insaponifiable de foies de sujets non cancéreux.

Dans le lot 4, chaque animal a reçu 1 cm^3 d'huile d'Olive neutralisée et stérilisée.

Les résultats observés à la fin de l'expérience, après deux ans et demi, ont été les suivants, en éliminant dans chaque série les animaux morts au cours de la première année :

Dans les lots injectés avec l'insaponifiable de foies de sujets cancéreux (lots 1 et 2), nous avons observé 6 tumeurs sur 28 animaux survivants.

Dans le lot des foies cancéreux sans métastases (lot 1), il y en eut 4 tumeurs sur 13 animaux survivants : deux sarcomes de la cuisse, un sarcome de la paroi thoracique et un épithélioma mammaire de la région inguinale.

Dans le lot des foies cancéreux avec métastases (lot 2), il y eut 2 tumeurs sur 15 animaux survivants : un sarcome de la cuisse et un épithélioma cutané de la région thoracique gauche (figure 5).

Par contre, aucune tumeur n'apparut dans les lots témoins (lots 3 et 4) : lot injecté avec l'insaponifiable de foies de sujets normaux (lot 3), où il y avait 10 Souris survivantes et lot injecté avec l'huile d'Olive seule (lot 4), où, sur 9 Souris survivantes, une seule a présenté un petit adénome pulmonaire, comme on peut en voir spontanément chez la Souris.

En dehors de ces tumeurs, nous avons constaté, comme dans nos premières expériences, des hépatomégalies dans les lots injectés avec les insaponifiables de foies. Nous en avons observé, à partir du dix-septième mois, 7 cas dans les séries d'insaponifiables de foies cancéreux; la plupart correspondaient à des lésions de réticulo-endothéliose diffuse, mais, dans un cas, le foie était quintuplé de volume, pesant près de 8 grs avec des foyers nodulaires d'aspect tumoral et la lésion correspondait histologiquement à une réticulo-sarcomatose.

Dans la série d'insaponifiables de foies normaux, il y avait aussi deux cas de réticulo-endothéliose, constatés après dix-sept mois et demi, alors qu'il n'en existait pas dans la série injectée avec l'huile d'Olive pure. Par contre, nous n'avons pas observé la formation de kystes hémorragiques macroscopiques, comme dans notre première expérimentation.

L'apparition des kystes hémorragiques et des lésions hépatiques à caractère prolifératif, parfois tumoral, nous paraît donc un phénomène contingent. *Seule, l'existence des sarcomes sous-cutanés constitue un fait primordial confirmant les observations faites antérieurement.*

Certes, le pourcentage de ces sarcomes, 4 sur 28 animaux survivants, soit 14 %, est inférieur à celui de 30 % observé précédemment; de plus, le temps de latence nécessaire à l'apparition des tumeurs est notablement allongé, puisque celles-ci se sont développées seulement à partir du seizième mois, tandis qu'antérieurement elles étaient survenues dès le douzième mois. Cette diminution du pourcentage de tumeurs et l'augmentation du temps de latence tiennent sans doute à un incident évolutif, car la plupart des Souris ont eu une nécrose cutanée dans les jours qui ont suivi l'injection et une partie importante du produit injecté a été éliminée, si bien que la dose active a été certainement inférieure à celle des premières expériences (0 gr. 12).

Certaines constatations, surprenantes au premier abord, peuvent s'expliquer en analysant les faits expérimentaux. C'est, d'une part, le siège anormal de tumeurs, puisque l'injection a été faite dans la région dorsale; d'autre part, la variété tumorale.

Le siège des tumeurs, au niveau de la cuisse ou de l'aine, devient compréhensible quand on sait que la suspension injectée s'étale dans le plan sous-cutané et fuse dans des régions très éloignées du point d'injection pour aller s'accumuler au point déclive; c'est ainsi que nous en avons observé les traces presque constantes sous forme de fins granules crétacés, jaunâtres, gros comme une tête d'épingle (figure 6), ou de petits kystes huileux dans des régions inattendues; le plus souvent à la racine de la queue ou même à la face postérieure des cuisses, parfois au niveau de la paroi abdominale antérieure. L'apparition de trois sarcomes au niveau de la cuisse s'explique donc aisément.

Le type histologique des tumeurs mérite aussi d'être discuté.

Alors que les tumeurs du type sarcomateux, analogues à celles constatées dans nos premières expériences, semblent bien en rapport avec la substance injectée, par contre, celles du type épithélioma suscitent davantage de réserves. L'épithélioma mammaire de siège inguinal pourrait être une tumeur spontanée, bien que, depuis cinq ans, dans notre élevage de Souris, nous n'ayons pas observé un seul cas de ces tumeurs mammaires; en outre, nos observations sur la diffusion de la solution huileuse et la constatation de granules résiduels au contact même de la tumeur inciteraient à le considérer comme dépendant de l'activité cancérigène

du produit; d'ailleurs, SCHABAD lui-même, dans ses premières expériences, avait obtenu un épithélioma mammaire qu'il avait considéré comme dû au produit injecté. De même, l'épithélioma cutané, observé dans la région thoracique, pourrait être attribué à l'action du même facteur cancérigène; nous ne l'avons pas fait, car nous avons constaté dans notre élevage d'autres cas d'épithéliomatose cutanée au début. Mais, même si l'on considère ces deux tumeurs comme spontanées, ainsi que nous l'avons fait par prudence en établissant notre statistique (sinon notre pourcentage de tumeurs aurait été de 21 %), on peut admettre que le produit injecté a favorisé leur apparition, de même que pour les autres néoplasies signalées lors de nos premiers essais.

En résumé, les résultats de cette nouvelle série d'expériences confirmaient l'action cancérigène de l'insaponifiable de foies de sujets cancéreux, action que ne possède pas l'insaponifiable de foies de sujets non cancéreux.

Ils apportaient une base expérimentale à l'hypothèse de la production de substances cancérigènes dans l'organisme humain.

CHAPITRE IV

RECHERCHES DE DIVERS AUTEURS SUR L'ISOLEMENT DE FRACTIONS CANCÉRIGÈNES A PARTIR DE L'ORGANISME CANCÉREUX

Il nous paraît important, avant d'exposer nos tentatives de fractionnement des insaponifiables actifs, d'analyser toute une série de publications parues sur le même sujet, de 1939 à 1947.

Ce sont tout d'abord les recherches de SOBOTKA et BLOCH (360), à la suite de BRIKKER et TIMOFEJEWA (49), qui, après avoir soumis l'urine de sujets cancéreux à une extraction par l'éther butylique, saponifièrent l'extrait ainsi obtenu pour en obtenir l'insaponifiable par extraction benzénique. Ils notèrent, dans ces conditions, la présence d'une grande quantité de cholestérol dans l'urine des cancéreux, comparativement aux sujets normaux. Mais, après injection à la Souris de cet insaponifiable urinaire en solution huileuse, ils n'obtinrent aucune tumeur. Un résultat négatif fut également obtenu par BOWMAN et MOTTSCHAW (43) avec des extraits benzéniques ou éthérés d'urine de cancéreux appliqués en badigeonnages cutanés ou injectés en solution dans l'huile d'Olive ou dans une solution physiologique. En revanche, STEELE, KOCH et STEINER (362), obtinrent des résultats positifs, aussi bien d'ailleurs avec l'urine de sujets normaux qu'avec l'urine de sujets cancéreux. Ils soumirent l'urine à une première extraction par le benzène à *p*H 3,4-5,8, dans un extracteur sous pression réduite du type de celui utilisé pour l'extraction quantitative des hormones sexuelles. Après cette extraction au benzène, l'urine fut

soumise à l'extraction dans les mêmes conditions par l'alcool butylique normal. Les deux extraits obtenus ont été dissous dans l'huile de Sésame et injectés à la Souris par voie sous-cutanée. Avec l'extrait benzénique et à faible dose (10 mgr.), les auteurs n'obtinrent aucune tumeur. En revanche, l'injection de l'extrait avec l'alcool butylique fit apparaître, en seize à vingt-trois mois, chez 3 animaux sur 34 mis en expérience, trois fibro-sarcomes.

Parmi les auteurs qui, comme nous, ont travaillé sur le foie, il faut citer :

1° Des Ligneris (93), du « South African Institute for Medical Research ». Cet auteur partit du fait que les Nègres Bantu de l'Afrique du Sud présentent un pourcentage très élevé de cancers primaires du foie, surtout comparativement aux Européens qui vivent dans la même région (38), et choisit comme matériel de travail le foie de ces Indigènes; il en prépara des insaponifiables et constata que ceux-ci provoquaient, en badigeonnages cutanés (solution à 0,5 % dans l'éther), des tumeurs bénignes, mais aussi des tumeurs malignes. Avec les insaponifiables de foies *cancéreux* de ces Indigènes, Des Ligneris obtint ainsi, en huit mois, 25 tumeurs cutanées dont 7 étaient malignes; comparativement, les insaponifiables de foies de Nègres Bantu non cancéreux provoquèrent deux tumeurs cutanées, dont une maligne, alors que les insaponifiables de foies de sujets Européens non cancéreux ne provoquèrent aucune tumeur. L'auteur considéra ses résultats comme un argument en faveur de l'existence d'un terrain précancéreux.

2° Hieger (167), qui expérimenta avec des insaponifiables de foies de sujets cancéreux qu'il avait personnellement préparés et aussi avec des insaponifiables de foies de Nègres Bantu qui lui avaient été adressés par Des Ligneris. Au lieu de les appliquer sur la peau en badigeonnages cutanés, il les injecta par voie sous-cutanée en solution dans du lard. Les résultats qu'il obtint sont condensés dans le tableau n° 6.

3° Craciun, Zugravesku, Ursu et Manolescu Motoc (84) : ces auteurs ont, à vrai dire, opéré sur un cancer primaire du foie qu'ils ont épuisé successivement avec divers solvants : benzène, éther à froid, éther à chaud, cyclohexane. Les fractions obtenues ont ensuite été injectées à des Souris. Avec l'une d'entre elles, celle dissoute par l'éther à froid, les auteurs ont obtenu, au voisinage du point d'injection, des adéno-carcinomes donnant des métastases pulmonaires, mais non transplantables.

4° Vincenti (394) : cet auteur, après injection au Rat d'un extrait benzénique de foies de cancéreux, obtint, en huit à dix mois, des sarcomes chez 25 % environ des animaux traités; mais il faut bien souligner que l'auteur italien injectait son extrait en solution dans du benzène. Il est le seul, en effet, qui ait obtenu des sarcomes chez le Rat.

5° Steiner (364) : c'est un des auteurs qui se sont occupés avec le plus de fruit de cette question. Dans sa première communication (364),

il exposa les résultats obtenus avec des insaponifiables préparés à partir de foies de sujets cancéreux, par épuisement au dichloréthylène, après saponification par la potasse alcoolique. Injectant ces fractions dissoutes

TABLEAU VI

Résultats des premières expériences de Hieger (167).

	Nombre de souris		Sarcomes au point d'injection
	Au début de l'expérience	Au bout d'un an	
1. Insaponifiable de 3 foies de sujets cancéreux	28	17	11
2. Insaponifiable de foies de Nègres Bantu envoyés par Des Lignéris	30	19	5
3. Extrait éthéré de 2 foies de sujets cancéreux ..	37 souris très jeunes	7	0
4. Extrait éthéré de 2 foies de sujets cancéreux ..	17 souris adultes	7	0
5. Extrait benzénique de 4 foies de sujets cancéreux	60	15	0
6. Insaponifiable de 3 foies de sujets cancéreux ..	27	18	0
7. Insaponifiable de 3 foies de sujets non cancéreux	40	19	0
8. Lard. Série témoin ...	303	142	0

dans l'huile de Sésame, à des Souris d'une souche réfractaire au cancer, il obtint, entre cent quatre-vingt-deux jours et seize mois, des sarcomes au point d'injection chez 13 sur 56 des animaux traités; alors que les animaux, injectés avec les insaponifiables de foies de sujets normaux, ne firent pas de cancer, non plus d'ailleurs que ceux injectés avec les insaponifiables privés de cholestérol extraits des tumeurs elles-mêmes et non plus du foie.

L'auteur américain continua ses recherches, dont il publia les résultats en plusieurs mémoires, de 1941 à 1943 (371 *b*). Ces résultats sont condensés dans le tableau n° 7.

La grande originalité des résultats de Steiner, c'est d'avoir eu l'idée d'examiner séparément les insaponifiables de chaque foie traité. D'après lui, les substances cancérigènes ne seraient présentes à concentration suffisante que d'une manière sporadique, aussi bien d'ailleurs dans les foies de sujets cancéreux que dans ceux de sujets normaux. Trente-sept foies de sujets cancéreux fournirent ainsi 8 insaponifiables actifs (22 %), alors que 30 foies de sujets non cancéreux fournirent 6 insaponifiables actifs (20 %). En résumé, un foie sur cinq, d'après Steiner, contiendrait des substances cancérigènes décelables.

La grosse différence, par conséquent, entre les résultats de Steiner et les nôtres, c'est que nous n'avons jamais obtenu de cancer avec les insaponifiables de foies de sujets normaux. Il nous paraît essentiel de faire à ce sujet deux remarques.

a) On ne peut être sûr que les sujets non cancéreux examinés par Steiner n'auraient pas fait ultérieurement de cancer.

b) Il est possible que le foie, même normal, renferme des substances cancérigènes qui ne manifesteraient leur action que lorsqu'une concentration suffisante est atteinte. Peut-être aussi, le foie, dont on sait le rôle détoxiquant vis-à-vis de nombreuses substances, accumule-t-il les substances cancérigènes produites dans l'organisme, en vue, précisément, de soustraire ce dernier à leur action.

6° Schabad et ses collaborateurs (204) : ces auteurs ont évidemment continué leurs recherches. Leurs résultats sont condensés dans le tableau n° 8 que, comme les autres, nous empruntons à Hieger (168).

Ce qui frappe dans ces résultats, c'est la rareté des sarcomes au point d'injection, relativement au nombre de tumeurs, parfois considérable, qui se développent à distance. Mais, dans ce cas, la relation de cause à effet est beaucoup plus discutable, et c'est la raison pour laquelle, dans nos expériences, nous n'avons tenu compte, pour l'établissement de nos pourcentages, que des sarcomes développés au point d'injection. D'ailleurs, Schabad et ses collaborateurs ont, dans leurs séries témoins, injectées avec le seul solvant, obtenu un nombre imposant de tumeurs à distance, et plus précisément 40 tumeurs sur 389 Souris ayant survécu plus de huit mois.

On peut noter également que les auteurs ont travaillé, non seulement sur le foie, mais encore sur le poumon, organe dont on sait l'intervention prépondérante dans le métabolisme des lipides. De fait, d'après leurs résultats, il semble bien exister dans le poumon des sujets cancéreux des substances à action cancérigène.

Cette remarque nous amène tout naturellement à analyser les recherches effectuées sur d'autres organes que le foie.

TABLEAU VII

Résultats des expériences de Steiner (371)

Matière utilisée	Sarcomes au point d'injection	
1. Insaponifiable de 8 foies de sujets cancéreux (mélangés)	12 sur 56 Souris	14/30 (1)
2. Insaponifiable de 7 foies de sujets non cancéreux (mélangés)	5 » 63 »	17 54
3. Insaponifiable de 37 foies de sujets cancéreux (essayés séparément) : 8 trouvés actifs	12 » 456 »	274 (12 mois)
4. Insaponifiable de 30 foies de sujets non cancéreux (essayés séparément) : 6 trouvés actifs	10 » 440 »	277 (12 mois)
5. Extrait benzénique d'un foie de sujet cancéreux	0 » 32 »	16/26
6. Extrait benzénique de 11 foies de sujets cancéreux :		
a) Fraction soluble dans l'éther	0 » 15 »	10/14
b) Fraction insoluble dans l'éther	0 » 67 »	41/66
c) Insaponifiable de *a*)	0 » 17 »	12/17
7. Insaponifiable de 4 cancers humains	0 » 45 »	32/42
8. Insaponifiable de 10 cancers humains privé de la grande majorité du cholestérol par cristallisation	0 » 35 »	7/35
9. Témoins à l'huile de Sésame	0 » 18 »	
		Survivants après 12 mois
10. Huile de Sésame chauffée (350° C.)	3 » 31 »	9
11. Lipides de substances alimentaires surchauffées	0 » 20 »	19
12. Insaponifiable de 11	0 » 10 »	8
13. (11) d'où excès de lipides enlevés par l'acétone; résidu extrait au benzène; extrait benzénique	1 » 20 »	18
14. Insaponifiable de 13	0 » 8 »	7
15. (1) et (2) chez le Rat	Aucune tumeur	

(1) Fractions : Le numérateur exprime le nombre de tumeurs du poumon, des tissus lymphatiques, de la mamelle, de l'utérus, de l'ovaire ou du foie chez les survivants ; le dénominateur exprime le nombre de survivants après 6 mois.

Il faut, de ce point de vue, citer en première ligne les recherches de Menke (258) ; les premiers travaux de cet auteur ont été effectués sur des cancers du sein. Les tumeurs, recueillies dans l'acétone à 0°, ont été

extraites successivement, en opérant à la plus basse température possible, par l'acétone, l'éther, l'éther de pétrole et l'alcool absolu. Les fractions obtenues, après évaporation des solvants sous pression réduite, ont été réunies et, après dissolution dans une graisse neutre, injectées à des

TABLEAU VIII

Résultats des expériences de Kleinenberg, Neufach et Schabad. (204)

Matière utilisée	Nombre de Souris		Tumeurs	
	Au début	Au bout de 8 mois	Au point d'injection	Loin du point d'injection
1. Extrait benzénique de foies de 41 sujets cancéreux	179	108	4	62
2. Extrait benzénique de foies de 26 sujets non cancéreux	91	54	0	13
3. Témoins	634	389	0	40
4. Insaponifiable de 9 foies de sujets cancéreux ..... Extrait benzénique de Poumon (Insaponifiable ?)	50	29	1	8
5. 19 Poumons de sujets cancéreux	95	61	1	28
6. 20 Poumons de sujets non cancéreux	117	58	0	10

Souris impubères d'une souche à faible pourcentage de cancers spontanés; chez 1 animal sur 4 dans une série et 1 animal sur 5 dans une autre, des sarcomes fuso-cellulaires apparurent entre le deux cent vingt-neuvième et le deux cent quatre-vingt-deuxième jour après le début des injections.

Menke a ensuite procédé (259) au fractionnement de ses extraits. Les fractions préparées ont été les suivantes :

1° Fraction insaponifiable, obtenue par chauffage à reflux pendant six heures, avec de la potasse alcoolique à 10 % et extraction, soit de la solution diluée, avec de l'éther et de l'éther de pétrole, soit de la solu-

tion évaporée à sec sous pression réduite et mêlée à du sulfate de sodium anhydre, avec de l'éther de pétrole léger (P. E. : 20-40°).

2° Fraction précipitable par le digitonoside.

3° Fraction non précipitable par le digitonoside.

4° Fraction « non carbonyle » : fraction privée des substances à groupe carbonyle et, en particulier, des substances œstrogènes par l'utilisation du réactif de Girard et Sandulesco (144 *bis*) à base de chlorure de triméthylacétylhydrazide-ammonium (réactif T).

Ces diverses fractions ont été injectées à la Souris, par voie sous-cutanée, en solution dans l'huile de Sésame.

Chaque animal a reçu deux à quatre injections de 0 cm³ 2 à 0 cm³ 4, à des intervalles de une à trois semaines. Ces injections étaient pratiquées alternativement sur le flanc droit ou sur le flanc gauche.

Les résultats obtenus par Menke sont condensés dans le tableau n° 9.

Il est curieux de constater que, dans les expériences de Menke, la saponification semble faire disparaître l'activité cancérigène; à moins que, comme le suggère l'auteur lui-même, le ou les facteurs cancérigènes, différents dans cette hypothèse de ceux mis en évidence dans le foie, soient concentrés dans la fraction saponifiable.

Le résultat négatif, obtenu avec l'extrait de sein cancéreux total, apparaît, de prime abord, paradoxal, surtout si on le compare au résultat positif obtenu avec l'extrait de la zone purement cancéreuse. L'auteur suppose que les lipides environnant cette zone, passant dans les solvants d'extraction, diluent l'agent actif à une concentration telle que le seuil d'activité n'est plus atteint dans les essais sur l'animal.

Wachtel (396), après Menke, a préparé des extraits lipidiques à partir de cancers de l'estomac, de cancers du sein et de fibro-sarcomes. Ces extraits ont été dissous dans l'huile d'Amande douce et injectés, à la dose de 10, 20 ou 30 mgr., par voie sous-cutanée, à des Souris appartenant à une souche qui présentait moins de 2 % de tumeurs spontanées. Sur 74 animaux ayant survécu quatre mois après le début de l'expérience, 21, soit 28,4 %, ont présenté des tumeurs malignes qui se sont en général développées à distance du point d'injection.

Les extraits de cancers de l'estomac ont ainsi provoqué deux cancers mammaires chez deux femelles, deux lympho-sarcomes du poumon chez un mâle et une femelle, et un lympho-sarcome au point d'injection chez une femelle.

Les extraits de cancers du sein ont provoqué quatre cancers mammaires chez quatre femelles, un lympho-sarcome du poumon chez une femelle, un cancer du foie chez un mâle et deux lympho-sarcomes au point d'injection chez deux femelles.

Les extraits de fibro-sarcomes ont provoqué quatre cancers mammaires chez quatre femelles, un lympho-sarcome pulmonaire chez une femelle, un

cancer pulmonaire chez un mâle, un cancer du rein chez un mâle et un lympho-sarcome au point d'injection chez une femelle.

Tous les extraits utilisés ont fourni sensiblement le même pourcentage de tumeurs. Le temps moyen de développement était de six mois avec les extraits de cancers de l'estomac, onze mois avec les extraits de cancers du sein, sept à six mois avec les extraits de fibro-sarcomes.

TABLEAU IX

Résultats des expériences de Menke (259)

Matière utilisée	(A) Extrait au Soxhlet par 4 solvants	(B) Insaponifiable de A	(C) Fraction précipitable au digitonoside	(D) Fraction non précipitable au digitonoside	(E) Fraction non carbonylé
1. Cancer du Sein. Zone cancéreuse isolée. 3 extraits de 3 tumeurs	7/36 (1)				
2. Sein cancéreux après enlèvement de la zone cancéreuse : 2 extraits à partir de 2 seins	0/33	0/18	0/6	0/6	
3. Sein cancéreux en entier (zone cancéreuse + tissu environnant 2 échantillons)	0/18	0/22			0/18
4. Sein non cancér., 4 échantillons	0/54	0/36			
5. Cancer du Rectum.....	0/15	0/6			
6. Sarcome ostéogénique (Fémur)	1/12				

(1) Fractions : Numérateur = nombre de sarcomes provoqués. — Dénominateur = nombre de Souris.

L'auteur a essayé de concentrer l'activité par des fractionnements. Il en est résulté une baisse d'activité marquée.

Notons que le même auteur (397) a préparé, à partir des lobes de l'hypophyse de Bœuf, par épuisements successifs avec divers solvants (acétone, éther, alcool éthylique), des extraits lipidiques qui, injectés à des Souris de souche analysée, en solution dans l'huile d'Amande douce, ont provoqué des tumeurs, en général à distance du point d'injection,

chez 26,8 % des 67 animaux injectés. Le délai d'apparition moyen est plus court (neuf mois) pour les extraits du lobe antérieur que pour ceux du lobe postérieur (quatorze mois).

Enfin, Hieger (168), à la lumière des résultats déjà acquis par nous-mêmes et les auteurs dont nous avons analysé les travaux, a extrait les lipides de divers tissus (foie, poumon, rein, muscle) de sujets normaux ou cancéreux. Il les a ensuite soumis à la saponification, puis au fractionnement. Nous indiquons, dans les tableaux n^{os} 10 et 11 annexés, le schéma de la technique suivie par Hieger, technique dérivée de celle utilisée pour l'obtention d'extraits concentrés en vitamines A à partir du foie. Dans un autre tableau (n° 12), nous avons condensé les chiffres correspondant aux taux des diverses fractions dans les tissus examinés.

Ces fractions ont été dissoutes dans du lard fondu, en général dans la proportion de 15 %. Hieger en a injecté dans le flanc de la Souris, par voie sous-cutanée, 0 cm^3 1 à 0 cm^3 2, à plusieurs reprises (en général 4 ou 6), de manière à maintenir toujours un petit nodule de graisse sensible à la palpation. Souvent, il a suffi de cinq à six injections pour aboutir à ce résultat et le maintenir pendant une année et plus; mais, dans un certain nombre de cas, il a fallu effectuer des injections supplémentaires.

Les résultats obtenus par Hieger sont condensés dans le tableau n° 13.

Nous avons analysé très longuement les résultats de Hieger à cause de leur importance. On voit qu'ils confirment ceux de Steiner relativement à la présence de fractions cancérigènes dans l'insaponifiable de foies de sujets normaux et ceux de Menke, relativement à la présence de substances cancérigènes dans d'autres organes que le foie.

Nous citerons, pour terminer, les recherches d'auteurs qui se sont occupés, non plus d'organes humains, mais d'organes animaux. Nous avons déjà mentionné les résultats de Wachtel (397) avec les extraits lipidiques d'hypophyse de Bœuf. Mais il s'agissait là d'un organe d'animal normal, examiné seulement en raison de l'intervention éventuelle de sa sécrétion hormonale dans les processus de cancérisation.

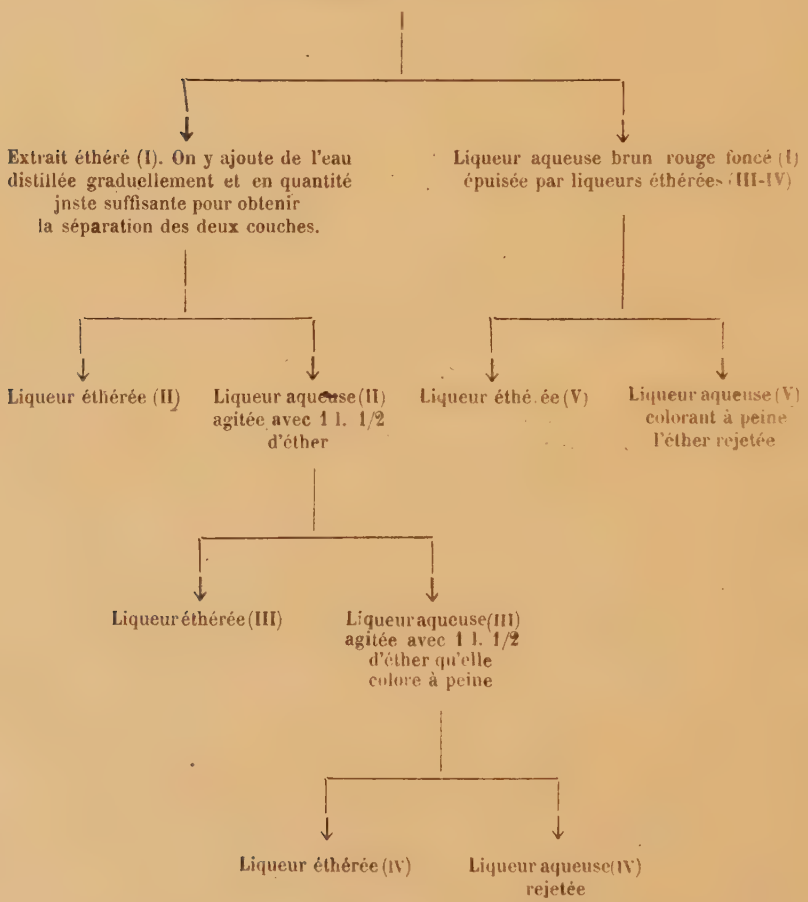
Engel (116), lui, a opéré, non pas sur une tumeur humaine, mais sur une tumeur animale, en l'espèce un cancer du rectum prélevé sur un Ane. Il en a préparé par épuisements successifs avec l'alcool, l'éther, l'acétone, puis le benzène à chaud, un extrait qui, injecté à la Souris, a conduit, chez un des animaux, à un cancer des vésicules séminales.

Hieger (169) est parti de tissu mammaire de Souris de souche sélectionnée (D. L. B.) considéré par lui comme précancéreux. Il a effectué ses prélèvements sur des animaux allaitant, après sevrage des petits. Il en a préparé, par épuisement à l'éther, un extrait qu'il a injecté en solution dans l'huile d'Olive à de jeunes Souris femelles. Il a obtenu un sar-

TABLEAU X

Schéma de la technique utilisée par Hieger (168) pour la préparation des Insaponifiables.

1.400 grs Foie pulpé additionné de 350 grs potasse solide et de 1 l. d'alcool à 95°
Reflux au bain-marie pendant 2 h. 1/2.
Refroidissement : liqueur d'un volume total de 2 l. 1/4. On divise en 2 portions que l'on agite chacune avec 1 l. 1/2 d'éther dans un séparateur.
On mélange les extraits éthérés :



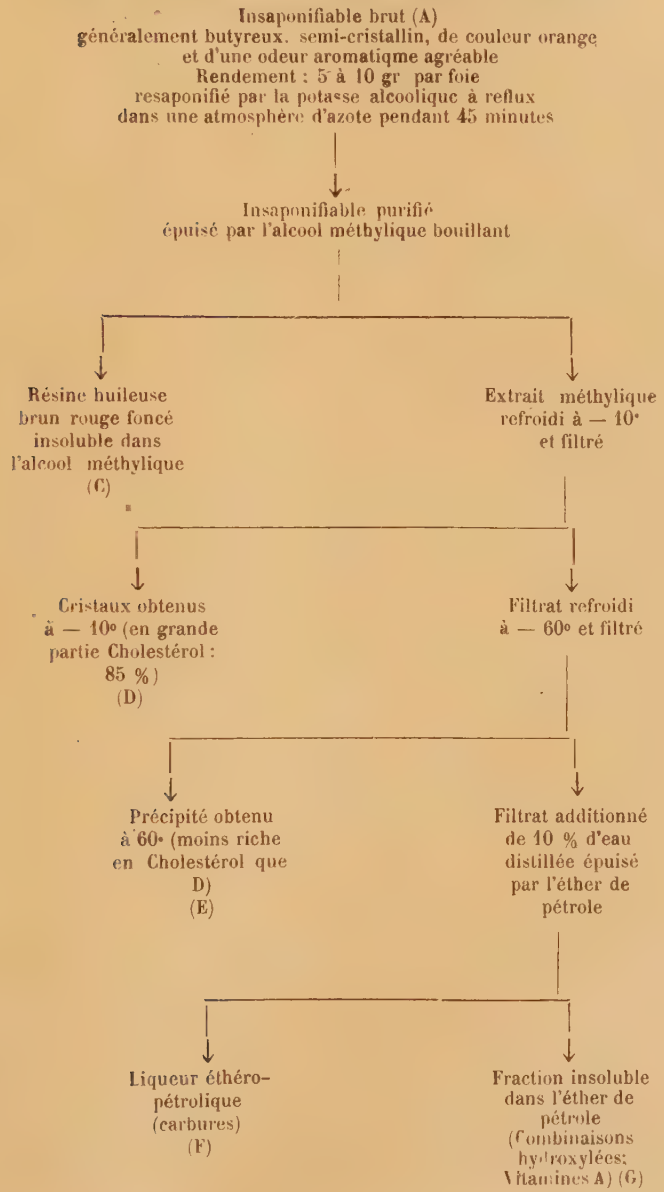
Les liqueurs éthérées (II) (III) (IV) (V) sont réunies, lavées et évaporées

↓

Résidu A. (Insaponifiable brut).

TABLEAU XI

Schéma de la technique utilisée par Hieger (168) pour le fractionnement des Insaponifiables.



come fuso-cellulaire et deux épithéliomas mammaires, mais les témoins, injectés avec l'huile d'Olive seule, ont également présenté quatre épithéliomas mammaires.

Enfin, Aptekman, King et Lewis (5) ont travaillé sur des sarcomes spinocellulaires obtenus avec un carbure cancérigène et ayant subi 20 à 40 passages. Ils en ont préparé un extrait benzénique qui, après évaporation du solvant, a été injecté tel quel, après léger tiédissement, à raison

TABLEAU XII

Taux des diverses fractions de Hieger (168).

Fractions	Foies de sujets non cancéreux	Foies de sujets cancéreux	Poumons Reins et Muscles de sujets non cancéreux	Poumons Reins et Muscles de sujets cancéreux
Nombre de sujets humains	4	4	16	10
Poids de tissu	6 kgs	6 kgs	34 kgs	19 kgs
Insaponifiable brut .. *A*	22 grs	30 grs	72 grs	72 grs
Insaponifiable purifié . *B*		19	40 grs	30 grs
			40 grs (à partir de 50 grs de A)	(à partir de 34 grs de A)
Fraction insoluble dans l'alcool méthylique . *C*		3	traces	petite quantité
Cristaux obtenus à —10° C ..... *D*	8	8	22 grs	15 grs
Précipité obtenu à —60° ..... *E*	3	2	3	4
Fraction soluble dans l'éther de pétrole .. *F*	2	1	2	1
Fraction soluble dans l'alcool méthylique à 90° ..... *G*		0,25	0,60	0 gr. 60

de 0 cm³ 12 à 0 cm³ 5 par animal. Dans les six mois qui suivirent, sur les 28 Rats mis en expérience, 5 firent des sarcomes fusocellulaires au point d'injection. Dans une autre série d'expériences, les mêmes auteurs soumirent à l'extraction par le benzène les foies de Rats greffés avec la tumeur originale. Ils obtinrent deux sarcomes sur 24 animaux expérimentés.

TABLEAU XIII

Production de sarcomes avec les fractions obtenues par Hieger. (168)

TISSUS	Fractions	SOURIS SURVIVANTES AU BOUT DE : 0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36 (Mois)	Sarcomes au point d'injection
Non-Cancers :															
Foie	D	20	15	12	11	8	6	3	3	1	0				
	E	15	9	7	5	5	3	2	2	0					
	F	15	10	10	9	6	6	6	3	1	0				
Poumon - Rein - Muscle	B	16	16	16	15	12	10	5	3*	0					
	D	25	15	15	14	14	8*	2	1*	0					1
	E	10	10	10	10	10	8	6	3	1	1	0			2
	F	10	10	10	10	10	9	7	4	1	0				
Cancers :	G	5	5	5	5	5	5	4	1	1	0				
Foie	C	10	10	9	9	8	6	4	3	2	0				
	D	10	10	10	10	9	6*	4*	3	3	0				
	E	10	8	8	8	8	6	3	3	0					2
	F	10	18	9	7	6	4	4	2	0					
Poumon - Rein - Muscle	B	25	15	15	15	14	11	6	3	2	1	0			
	C	10	9	8	8	0									
	D	25	16	15	14	10*	9	4*	0						3
	E	10	10	10	10	9	9	7	4	1	1	1	0		
	F	10	9	9	6	6	6	6	1	0					
	G	5	5	5	4	3	3	2	2	0					

* Apparition de tumeur.

Dans le même ordre d'idées et tout récemment, Roussy et Guérin (321) ont préparé, à partir des foies de Rats porteurs de sarcomes provoqués par insertion sous la peau d'un cristal de benzopyrène, des broyats dans l'eau physiologique qu'ils ont injectés à des Souris par voie sous-cutanée, à raison de 1 cm³ par animal. Leurs résultats ont été négatifs ; 3, sur 12 Souris survivant après un an, ont bien présenté des tumeurs cutanées du type adénome épithélio-sébacé, mais, contrairement à Schabad, les auteurs n'interprètent pas de telles tumeurs, observables chez les animaux témoins, comme rattachables à l'influence d'une substance cancérigène présente dans le broyat injecté.

CHAPITRE V

RECHERCHES PHYSIQUES, CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES SUR LES INSAPONIFIABLES ACTIFS. — LEUR FRACTIONNEMENT

Nous avons vu, dans le chapitre précédent, que la grande majorité des chercheurs qui se sont intéressés au problème des substances cancérigènes endogènes ont, pour la plupart, confirmé nos premières conclusions relatives à la présence de produits actifs dans les fractions lipidiques et, plus précisément, dans les fractions insaponifiables des foies de sujets cancéreux. Ils les ont même étendues à d'autres organes humains ou animaux.

Si certains résultats, comme ceux de Steiner, ou les derniers résultats de Hieger, s'opposent aux nôtres, c'est seulement sur la question de l'activité des insaponifiables de foies de sujets normaux que, personnellement, nous avons toujours trouvés dépourvus d'activité cancérigène. Nous avons en cours des expériences à ce sujet, mais il nous faut en attendre les résultats.

En revanche, ayant en main des insaponifiables reconnus actifs, nous avons procédé à plusieurs catégories de recherches à leur sujet :

1° Etude de l'action sur les cellules cultivées *in vitro*.

2° Etude spectrographique.

3° Essais de séparation de fractions par utilisation combinée des solvants organiques et de l'adsorption chromatographique.

4° Essais de fractionnement par l'utilisation de réactifs chimiques.

5° Expérimentation sur l'animal des fractions obtenues.

I. — ACTION DE L'INSAPONIFIABLE DE FOIES DE SUJETS CANCÉREUX SUR LES CULTURES DE TISSUS « IN VITRO »

Lorsque Carrel eut mis au point la technique de culture des tissus *in vitro*, les chercheurs s'intéressant à la cancérologie fondèrent de grands

espoirs sur cette nouvelle méthode d'investigation qui permettait de travailler directement sur la cellule et d'éliminer la participation du métabolisme général de l'organisme dans une cancérisation éventuelle. Ces espoirs furent malheureusement déçus. Un certain nombre d'auteurs prétendirent bien avoir cancérisé des tissus spléniques d'embryons de Poulet, en employant, soit, comme FISCHER (128), le goudron ou l'anhydride arsénique (en solutions très diluées), soit, comme LASER (222), le plasma d'une Poule soumise à des injections intraveineuses de goudron, soit, enfin, comme BISCEGLIE (33), les rayons X, mais leurs résultats n'ont pas été confirmés par d'autres expérimentateurs.

En outre, WHITMAN (408) a obtenu des résultats négatifs en soumettant des cultures de fibroblastes d'embryon de Poulet à l'action du radium.

L'isolement à partir du goudron ou la synthèse au laboratoire de carbures polycycliques à haute activité cancérigène (1.2.5.6 - dibenzanthracène; 3.4. benzopyrène, méthylcholanthrène, etc.), donna lieu à toute une série de recherches sur les tissus en culture. DES LIGNERIS (94), en 1935, prétendit avoir obtenu, par action du 1.2.5.6 dibenzanthracène, la cancérisation *in vitro* de cellules d'embryon de Poule, mais les autres recherches sur le même sujet, et en particulier celles de LEWIS (240), STERN (365), EARLE et VŒGTLIN (114), LARIONOW, IVACHENTZOVA et TCHERTKOVA (226), travaillant sur les fibroblastes de Poulet, Rat ou Souris, aboutirent à des résultats négatifs. Il en avait été de même des recherches poursuivies de 1933 à 1935 par le Bureau National d'Hygiène des Etats-Unis.

Enfin, l'auteur japonais MORIGANI (265) ne réussit pas davantage en faisant agir le *p*-diméthylaminoazobenzène sur les fibroblastes du cœur d'embryon de Poulet.

Ces résultats s'opposent à ceux, positifs, obtenus avec les virus cancérigènes, tels que les virus de FUJINAMI et de ROUS, en particulier par LUDFORD (248) *.

Nous avons pensé qu'il serait intéressant d'étudier l'action sur les cultures de tissus d'insaponifiables de foies de sujets cancéreux, reconnus actifs sur l'animal.

Les tissus utilisés pour la culture étaient, comme dans nos expériences avec le glutathion, des fibroblastes provenant du cœur d'embryon de

* Récemment, l'auteur américain EARLE (W. R.), du National Cancer Institute (Bethesda, U.S.A.), a publié, seul ou en collaboration avec NETTLESHIP (A.) (*J. Nat. Cancer Inst.*, 1943, *4*, 165 et 213), les résultats positifs d'une longue expérimentation avec le méthylcholanthrène. Il a fait agir le carbure à très faibles concentrations (1/10^{e} de mg à 2/10.000^{e} de mg par cm^{3}) sur des fibroblastes de Souris, en milieu hétérogène (sérum de Cheval dilué + extrait embryonnaire). Il a observé de nettes modifications dans la morphologie et la croissance des cellules en culture et, par injection à la Souris, ces dernières ont donné naissance à des sarcomes aux points d'injection.

Poulet ayant huit jours d'incubation. La technique a été celle des cultures dites « en goutte pendante ». Nous avons expérimenté avec un mélange d'insaponifiables de foies de sujets cancéreux sans métastases au niveau du foie, et aussi avec un mélange d'insaponifiables de foies métastatiques. Le seul solvant convenable pour dissoudre les insaponifiables a été l'huile d'Olive. La concentration des solutions que nous avons préparées pour notre expérimentation était de 0 gr. 01 par cm^3.

Trois séries d'essais ont été effectuées :

La première, avec l'insaponifiable de foies de cancéreux, sans métastases hépatiques (I).

La deuxième, avec l'insaponifiable de foies de cancéreux, avec métastases hépatiques (II).

La troisième (série témoin), avec de l'huile d'Olivre seule (III).

Dans tous les cas, une microgoutte de liqueur huileuse représentant environ 1/10.000e de cm^3 était, à chaque repiquage (5 à 6 en quinze jours), ajoutée au milieu de culture et mélangée avec lui.

Les résultats observés ont été les suivants :

Dans la série I, les cultures commençaient à dépérir souvent dès le premier repiquage et ne survivaient pas au second, si on ne les remettait pas dans un milieu normal sans huile.

Dans la série II, les cultures n'ont pas dépassé le quinzième jour, soit cinq repiquages; mais il en a été sensiblement de même avec la série témoin III, comme si la présence d'huile dans le milieu de culture gênait la croissance.

En général, les cultures commençaient à dépérir un ou deux repiquages avant celui où leur émigration s'arrêtait complètement. Mais, souvent, l'émigration d'une culture en pleine vigueur cessait tout à fait après un repiquage. On avait alors l'impression, au microscope, que la culture était englobée et noyée dans une goutte d'huile. Tant que durait l'émigration, les cellules émigrées contenaient d'énormes vacuoles lipidiques, d'ailleurs beaucoup plus grosses dans la série traitée par l'insaponifiable que dans la série témoin, comme si cet insaponifiable entraînait une dégénérescence graisseuse.

Afin de prolonger la durée de vie des cultures faites en présence de l'insaponifiable et de limiter le pourcentage de pertes de chaque repiquage dû au phénomène d'englobement que nous venons de signaler, une nouvelle série d'essais fut effectuée, en repiquant l'explant deux fois par semaine seulement et en réduisant de 50 % la quantité d'huile.

Dans ces conditions, un lot de fibroblastes fut maintenu en vie pendant vingt-trois jours, le dernier repiquage étant réalisé en milieu normal sans huile. L'explant fut alors greffé à un Coq en deux points, l'un intramusculaire, l'autre sous-cutané. Cette greffe ne donna lieu à aucune tumeur.

Il faut noter que, dans les cultures en présence d'insaponifiable, souvent certains noyaux présentaient un nucléole apparaissant comme pulvérisé en plusieurs grains. Cette observation est à rapprocher des anomalies nucléaires que, d'après divers travaux, entre autres, ceux de Hearne (161), Mauer (257), Creech (86) et Von Mœllendorff (395), provoquent les carbures cancérigènes agissant sur les cellules en culture.

Les conclusions que l'on peut tirer de ces premières recherches sont les suivantes :

1° La fraction insaponifiable de foies de sujets cancéreux qui, injectée à la Souris, provoque l'apparition de sarcomes chez 15 à 30 % des animaux, ne provoque pas, dans les conditions de nos expériences, la cancérisation des fibroblastes en culture. Il y a, de ce point de vue, analogie avec les carbures cancérigènes et opposition avec les virus cancérigènes.

2° Cet insaponifiable semble exercer une action inhibitrice vis-à-vis de la croissance des fibroblastes en culture. Cet effet est surtout marqué dans nos expériences avec l'insaponifiable provenant de foies sans métastases hépatiques. Il y a, là encore, analogie avec ce que la grande majorité des auteurs ont observé avec les carbures cancérigènes.

II. — ÉTUDE SPECTROGRAPHIQUE

Le spectre de fluorescence de notre insaponifiable actif a été déterminé au laboratoire de l'Identité judiciaire, que dirige le Professeur Sannié, avec le spectrographe de Huet et un dispositif expérimental analogue à celui décrit par Sannié et Poremski (331) dans leur étude sur les spectres d'absorption de dérivés du pyrène et du 3.4. benzopyrène. La source de lumière est constituée par un brûleur Gallois en quartz, à vapeur de mercure, à fort éclat. La lampe, refroidie par un courant d'air, consomme, en régime normal, 2,8 ampères sous 75-80 volts environ. Les rayons, filtrés à travers un bon verre de Wood (de Corning) sont concentrés sur un tube coudé à culot noirci et muni d'une fenêtre plane. Le tout est enfermé dans des boîtes étanches à la lumière. Les condensateurs renvoyant la lumière sur la fenêtre du spectrographe sont eux-mêmes montés dans des tubes noircis. De la sorte, on ne reçoit dans le spectrographe qu'un minimum de lumière diffuse. Le spectrographe de Huet employé n'enregistre pas les longueurs d'ondes inférieures à 3.800 Å. La lumière due à la fluorescence impressionne seule la plaque (les plaques employées étaient des plaques Fulgur sensibles jusqu'à 4.800-5.100 Å), ce qui élimine toute cause d'erreurs. Pour permettre les pointés des maxima, on encadre le spectre de fluorescence par les spectres d'arc du fer. Le temps de pose est choisi de façon à avoir une densité de 1,5 ou 2 dans la partie la plus sombre du spectre de fluorescence.

Le spectre de fluorescence a été déterminé sur une solution d'insaponifiable à 2 % dans l'hexane. Il a été enregistré avec le microphotomètre de Sannié.

Le spectre obtenu ne présentait rien de particulier et ne ressemblait en tout cas nullement aux spectres si typiques des carbures polycycliques condensés, tels que le 3.4. benzopyrène ou le méthylcholanthrène. Par ailleurs, nous n'avons observé aucune différence notable avec celui fourni dans les mêmes conditions par l'insaponifiable de foies de sujets normaux.

Nos résultats, de ce point de vue, ne cadrent pas avec ceux de PENN (284). Cet auteur prétend que les lipides extraits du foie de sujets cancéreux présentent une fluorescence, sous l'action des « ultra-violets », beaucoup plus intense que celle fournie par les lipides du foie de sujets normaux et que le spectre de fluorescence des lipides de foie de cancéreux est très proche de celui du méthylcholanthrène. HIEGER (170) a critiqué très vivement les résultats de PENN. Ses résultats sont superposables aux nôtres.

Enfin, en 1944, JONES et MAY (188) ont préparé, à partir d'insaponifiables de foies de sujets normaux et cancéreux, par diverses méthodes combinant l'emploi des solvants, de la chromatographie sur alumine activée et des réactifs chimiques (acide picrique en particulier), des fractions huileuses intensément fluorescentes en bleu et bleu vert. Le spectre d'absorption de l'ultra-violet de ces fractions a été déterminé. Il montre un maximum d'absorption de 2.550 à 2.600 Å Pas plus que dans le spectre de fluorescence, on ne peut y retrouver les fines bandes qui caractérisent les carbures cancérigènes polycycliques. De plus, l'intensité de la fluorescence est beaucoup moins affectée par l'action de l'oxygène que dans le cas des solutions de ces carbures. En tout cas, la fraction fluorescente manifeste une stabilité chimique considérable : elle résiste aux acides et aux alcalis; elle ne réagit pas avec les réactifs du groupe hydroxyle (anhydride succinique, pyridine + SO_3) non plus qu'avec le digitonoside, le réactif T de GIRARD, l'anhydride maléique ou une solution aqueuse d'hydrosulfite de sodium. Elle semble adsorbée spécifiquement par l'acide picrique en milieu alcoolique et ne renferme pas d'azote.

Ainsi, si les données spectrographiques ne tendent pas à faire admettre que le ou les composés fluorescents des insaponifiables de foies de sujets cancéreux appartiennent au groupe des carbures polycycliques, en revanche, leurs caractères chimiques les en rapprochent énormément. La question reste à étudier, car on sait combien les données spectrales sont faussées par la présence d'impuretés.

III. — ESSAIS DE SÉPARATION DE FRACTIONS PAR UTILISATION COMBINÉE DES SOLVANTS ORGANIQUES ET DE L'ADSORPTION CHROMATOGRAPHIQUE

Nous avons essayé de séparer les fractions par utilisation de l'alcool méthylique, solvant qui, à chaud, dissout beaucoup plus de cholestérol

qu'à froid. Nous avons traité 10 gr. d'insaponifiable par 100 cm³ d'alcool méthylique bouillant. Il est resté dans ces conditions un léger résidu insoluble constitué par une huile brun-rouge (fraction I); cette huile ne renferme pas d'azote. Après filtration, la liqueur méthylique a été portée à la glacière à — 4° pendant une nuit. Des cristaux se sont déposés. Il s'agissait de cristaux jaunâtres, que nous avons pu obtenir à peu près blancs après deux dissolutions dans l'alcool méthylique bouillant. Leur point de fusion, 146°, indique qu'il s'agit alors de cholestérol à peu près pur. A partir de 10 gr. d'insaponifiable, nous avons ainsi obtenu 2 gr. 65 de cholestérol (fraction II).

Les liqueurs méthyliques ayant servi à l'obtention du cholestérol ont été évaporées sous pression réduite, en atmosphère d'azote, ce qui nous a donné une masse jaunâtre (fraction III) présentant encore de façon très nette les réactions des stérols et aussi la réaction de Carr et Price (coloration bleue avec le trichlorure d'antimoine en milieu chloroformique), ainsi que celle de Rosenthal et Erdelyi (319) avec le même réactif en présence de 0,5 % de pyrocatéchol (coloration rouge violette qui est considérée comme spécifique de la vitamine A). Cette fraction III renferme un peu d'azote.

Le fractionnement n'a pas été poussé plus avant à l'aide de cette méthode et nous n'avons pas encore de résultats dans l'expérimentation biologique des trois fractions déjà obtenues.

Nous avons également procédé à des essais chromatographiques, en utilisant la technique de la chromatographie sous pression qui nous avait servi dans la purification du 3.4. benzopyrène.

Divers solvants ont été utilisés : benzène, benzène + 1 % d'alcool éthylique ; benzène + éther de pétrole léger à volumes égaux ; mélange benzène (1 partie) + essence (4 parties).

Comme adsorbants, nous avons employé : l'alumine activée par la technique que nous avons décrite à propos de la purification du benzopyrène; le carbonate de chaux activé suivant une technique sensiblement analogue et le mélange à poids égaux des deux adsorbants.

Le meilleur solvant est le mélange benzène + éther de pétrole léger à volumes égaux, avec une concentration en insaponifiable de 2 gr. pour 150 cm³. Le benzène seul est à rejeter, car, avec ce solvant, il n'y a pas de fixation sensible; l'éther de pétrole également, car, en l'employant, il ne reste rien dans le solvant et tout est fixé dans la colonne.

Après filtration sur une colonne d'alumine activée de 15 cm. et sous une pression de 45 cm., nous avons obtenu deux zones principales dans la colonne :

1° Une zone supérieure jaune présentant, sous la lumière de Wood, une fluorescence verdâtre;

2° Une zone inférieure incolore, présentant, sous la lumière de Wood une fluorescence bleue.

L'élution de ces deux zones par du benzène renfermant 1 % d'alcool éthylique nous a fourni deux fractions dont l'étude chimique et biologique reste à faire.

IV. — ESSAIS DE FRACTIONNEMENT PAR VOIE CHIMIQUE

C'est dans cette voie que nous avons obtenu les meilleurs résultats.

A Précipitation par le digitonoside

La première étape a été l'isolement des substances stéroliques précipitables par le digitonoside.

La technique suivie a été la suivante, adaptée de celle proposée en 1909 par WINDAUS (414).

On dissout 1 gr. d'insaponifiable dans 200 cm³ d'alcool absolu, et on place la solution dans un ballon surmonté d'un réfrigérant à reflux. Le liquide bouillant est additionné de 350 cm³ de solution bouillante de digitonoside à 1 % dans l'alcool absolu. On ajoute à l'ébullition la quantité d'eau distillée nécessaire pour amener le titre alcoolique à 95° (soit 24 cm³).

On laisse déposer pendant deux heures, puis on décante sur un filtre de GOOCH, en vérifiant que la liqueur alcoolique ne précipite plus par le digitonoside. Cette liqueur est alors mise à part; on lave le précipité avec 20 à 30 cm³ d'alcool à 95°, puis, à trois reprises, avec 20 à 30 cm³ d'éther anhydre exempt de peroxydes. On sèche ensuite le précipité à 100° et on le pèse.

On réunit l'alcool de lavage et l'éther à la liqueur alcoolique mise à part et la liqueur finale est concentrée au B. M. à 20 cm³. On y verse alors 150 cm³ d'éther anhydre, puis l'éther de lavage du complexe pour précipiter le digitonoside. Après une heure, on centrifuge et on lave plusieurs fois à l'éther. On réunit les solutions éthérées et on évapore sous azote. On obtient ainsi « l'insaponifiable X », c'est-à-dire l'insaponifiable privé des stérols précipitables par le digitonoside. Cette fraction se présente sous forme d'une masse brune homogène, d'aspect cireux et d'une odeur agréable rappelant le miel.

Pour récupérer les stérols à partir du complexe, nous avons eu recours à la technique de BERGMANN (25) à la pyridine, qui nous a donné de meilleurs résultats que celle de WINDAUS au xylol (414).

Le complexe est dissous dans 10 à 20 fois son poids de pyridine anhydre et la solution est portée à 70-100° pendant une heure, sous atmosphère d'azote. On chasse ensuite la pyridine aussi complètement que possible par distillation dans le vide. Le résidu est traité à deux reprises par 25 cm³ d'éther anhydre, puis pulvérisé finement et épuisé à nouveau avec 500 cm³ d'éther anhydre dans un appareil de SOXHLET pendant une heure.

On réunit les liqueurs éthérées, on filtre et évapore à siccité sous atmosphère d'azote. On obtient ainsi les stérols précipitables par le digitonoside avec un rendement supérieur à 90 %.

Le digitonoside qui reste après l'extraction éthérée est également récupéré avec un rendement excellent. Il est traité par une quantité suffisante d'alcool à 95° chaud pour faire une solution à 1 % que l'on filtre après un repos de vingt-quatre heures. La faible proportion non dissoute, constituée par une petite quantité de complexe non dissocié est soumise à un deuxième traitement à la pyridine, ce qui permet d'obtenir une nouvelle quantité de stérols, et porte le rendement total aux environs de 98 %.

A partir de 52 grammes d'insaponifiable total, nous avons ainsi obtenu 15 gr. de stérols (fraction I), ce qui représente un pourcentage de 28,3 %. Cette fraction était blanche et présentait un P. F. : 146°, ce qui est très proche du point de fusion du cholestérol pur.

B. Utilisation du sel de Reinecke
Isolement de la lignocérylsphingomyéline

L'insaponifiable X obtenu après précipitation par le digitonoside renferme de l'azote. Il donne encore les réactions colorées de Lieberman et Salkowsky. Pour en séparer les fractions azotées, nous avons pensé à utiliser le sel de Reinecke, sel complexe qui est le sel d'ammonium de l'acide chromidiammoniotétrasulfocyanique à 1 molécule d'eau de cristallisation.

$$\begin{pmatrix} (NH_3)_2 \\ CR \\ (SCN)_4 \end{pmatrix} NH_4\, H_2\, O$$

et qui a été proposé par Christensen (69) comme réactif de précipitation des bases organiques. Il a été employé par Tannhauser et Setz (377) pour l'isolement des polydiaminophosphatides de la rate.

La technique que nous avons suivie s'inspire de celle mise au point par ces auteurs.

Il faut opérer en milieu aussi concentré que possible en raison de la solubilité appréciable des Reineckates et, pour la même raison, effectuer les lavages à la plus basse température possible.

On dissout 25 grammes « d'insaponifiable X » dans la quantité juste suffisante de méthanol (soit environ 50 cm³) à chaud. On ajoute à cette solution II gouttes d'acide chlorhydrique concentré, puis 25 cm³ de solution saturée, fraîchement préparée, de sel de Reinecke dans le méthanol. Le précipité se forme peu à peu. On abandonne vingt-quatre heures à la glacière. La liqueur surnageant le précipité doit être rouge ou rose, ce qui indique un excès de sel de Reinecke. On filtre à travers un creuset de verre poreux (G. 3). On lave avec 10 cm³ d'eau distillée très froide,

10 à 15 cm³ de méthanol glacé, et 10 à 15 cm³ d'éther également glacé. On dessèche dans le vide sulfurique à la température ordinaire.

Pour la décomposition du Reineckate, on dissout ce dernier dans 15 à 20 cm³ de méthanol à l'ébullition ; on ajoute à la liqueur méthylique chaude une solution saturée de nitrate d'argent dans le méthanol.

Le Reineckate d'argent se précipite et on l'isole par filtration. La liqueur filtrée incolore est ensuite privée de l'excès d'argent par un courant d'hydrogène sulfuré et, après séparation du sulfure d'argent par filtration suivie de lavages au méthanol, on évapore la liqueur finale sous azote, et on reprend finalement par un mélange à volumes égaux de chloroforme et d'acétate d'éthyle.

On obtient ainsi, à partir de 52 grs d'insaponifiable, 1 gr. 05 de produit azoté (fraction II) ne donnant plus les réactions des stérols, en particulier celles de Lieberman-Burchard, et de Salkowsky.

Ce produit présente un aspect semi-cristallin et une couleur jaune. Il renferme de l'azote et du phosphore.

Nous en avons préparé une nouvelle quantité dans le but d'en faire l'étude chimique. Le dosage de l'azote sur le Reineckate nous a fourni un taux de 9,98 %. Cela nous a incliné à penser que nous avions en mains le Reineckate plus ou moins pur de la lignocérylsphingomyéline ($C_{51}H_{103}N_8PO_7S_4Cr.$) pour lequel la théorie donne 9,72 % d'azote.

Nous avons alors effectué une saponification alcaline douce, par chauffage léger d'une dizaine de minutes avec une solution N/10 de soude dans l'alcool méthylique, du produit récupéré à partir du Reineckate. Après évaporation, sous pression réduite en atmosphère d'azote, nous avons repris le résidu alcalin par le chloroforme anhydre. La liqueur chloroformique a été ensuite évaporée et le résidu repris, d'abord par l'acétate d'éthyle, puis par l'acétone. La liqueur acétonique, concentrée et abandonnée à la glacière nous a fourni une petite quantité de cristaux aciculaires avec des fibres radiales, dont le point de fusion (90°-90°5) après quatre cristallisations dans l'acétone, cadrait avec celui indiqué par Tannhauser et Frankel (378) pour la lignocérylsphingosine, d'ailleurs isolée par ces auteurs de l'insaponifiable du foie de Mammifères.

$$CH^3-(CH^2)^{12}-CH=CH-CH-CHOH-CH^2OH$$
$$\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\quad |$$
$$CH^3-(CH^2)^{21}-CH^2-CO-NH$$

Lignocérylsphingosine

Les données de la micro-analyse aboutissent à la même conclusion :

$C_{42}\ H_{83}\ NO_3$ (649,7)

	Trouvé	Calculé
C %	77,57	77,35
H %	12,87	12,73
N %	2,16	2,48 (Dumas)

La faible quantité dont nous disposions ne nous a pas permis de vérifier le pouvoir rotatoire lévogyre.

En revanche, nous avons procédé à la scission de la lignocérylsphingosine, par rupture de la fonction amide au moyen de l'hydrolyse acide, d'après les indications de KLENK (205) et de FRANKEL et BIELSCHOWSKY (130) :

15 mgr. de substance ont été dissous dans quelques centimètres cubes d'alcool méthylique renfermant 10 % d'acide sulfurique en poids, puis chauffés pendant cinq heures au bain-marie dans un petit Erlenmeyer surmonté d'un micro-réfrigérant à reflux. Après séjour d'une nuit à la glacière, l'ester méthylique de l'acide lignocérique précipité, mêlé de sulfate de sphingosine. On filtre et le filtrat est agité avec de l'éther de pétrole bouillant (10 cm³). Le résidu sur le filtre et l'extrait obtenu à partir de la liqueur éthéropétrolique sont traités au réfrigérant à reflux pendant une heure par 5 cm³ de solution de soude à 5 % dans le méthanol. La solution méthylique de savon est diluée avec son volume d'eau distillée, puis agitée deux fois avec 15 cm³ d'éther qui enlève la sphingosine. Pour caractériser cette dernière, on sèche l'extractum éthéré sur sulfate de sodium anhydre et, après évaporation, on reprend le résidu par 2 cm³ d'alcool méthylique renfermant 1 goutte d'acide sulfurique. On évapore à demi-volume et, après abandon à la glacière pendant une nuit, on obtient une faible quantité (3 mgr.) de cristaux dont la microanalyse cadre avec les données théoriques pour le sulfate de sphingosine :

$(C_{18}\ H_{37}\ NO_2)^2\ SO_4\ H_2$ (696,7)

	THÉORIE	TROUVÉ
C %	62,01	61,90
H %	10,94	10,95

En outre, la solution méthylique alcaline, après épuisement à l'éther est diluée avec son volume d'une solution 2 N d'acide chlorhydrique pour acidifier le milieu et on peut alors extraire par l'éther l'acide lignocérique l'on obtient, après évaporation de la liqueur éthérée, et fait cristalliser dans l'acétone anhydre. Le point de fusion : 79° cadre avec celui indiqué par TANNHAUSER et FRANKEL (378), 78-79°. Il en est de même des données de la microanalyse.

$C_{24}\ H_{48}\ O_2$ (368,38)

	CALCULÉ	TROUVÉ
C %	78,18	78,32
H %	13,13	13,04

Il nous paraît, par conséquent, démontré que l'insaponifiable de foies humains, obtenu suivant notre technique opératoire, renferme une petite quantité de lignocérylsphingomyéline qui a résisté à la saponification.

C. Obtention de la Fraction III

La liqueur méthylique où a été effectuée la précipitation par le sel de

Reinecke, et à laquelle ont été joints l'alcool méthylique et l'éther de lavage, est évaporée sous pression réduite en atmosphère d'azote pour chasser l'éther ; on y précipite l'excès de sel de Reinecke par addition d'une solution saturée de nitrate d'argent dans le méthanol jusqu'à cessation de précipité. On filtre et lave le précipité avec du méthanol. Dans la liqueur, on fait passer un courant d'hydrogène sulfuré pour éliminer l'excès d'argent ; on filtre et lave avec du méthanol le précipité de sulfure d'argent. Les liqueurs méthyliques sont ensuite évaporées sous azote et en s'aidant du vide, et le résidu purifié par reprise à l'éther de pétrole léger qu'on évapore ensuite également sous azote et en s'aidant du vide.

Nous avons obtenu ainsi, à partir de 52 grs d'insaponifiable, 31 grs d'un mélange privé de stérols précipitables par le digitonoside et de corps azotés précipitables par le sel de Reinecke (fraction III).

Remarquons que ce mélange, s'il ne précipite plus par le digitonoside, renferme encore un peu d'azote et donne les réactions colorées des stérols, en particulier celles de Liebermann-Burchard et Salkowsky. Il ne renferme plus de phosphore. Son fractionnement est en cours par l'utilisation combinée de la séparation par les solvants organiques, de la chromatographie, de la sublimation dans le vide profond, et des réactifs chimiques, en particulier du réactif des substances à groupe carbonyle de Girard et Sandulesco (144 *bis*).

V. — EXPÉRIMENTATION SUR L'ANIMAL DES FRACTIONS OBTENUES

A. Expérimentation sur la Souris

Comme dans nos expériences antérieures, nous avons fait appel, comme comme solvant d'injection, à l'huile d'Olive neutralisée et nous avons opéré comparativement, d'une part avec l'insaponifiable total de foies de sujets cancéreux qui avait été soumis au fractionnement; d'autre part, avec l'huile d'Olive injectée seule.

Pour dissoudre les fractions aussi bien que l'insaponifiable total dans l'huile, nous avons effectué tout d'abord une dissolution dans l'éther de pétrole; nous avons mêlé ce soluté à l'huile et chassé ultérieurement l'éther de pétrole au bain-marie.

Nous avons ainsi préparé :

1° Solution I, renfermant 0 gr. 165 de fraction I (Stérols) par cm^3.

2° Solution II, renfermant 0 gr. 10 de fraction II (Fraction azotée) par cm^3.

3° Solution III, renfermant 0 gr. 20 de fraction III (Insaponifiable X) par cm^3.

4° Solution IV, renfermant 0 gr. 20 d'Insaponifiable total par cm^3.

Comme animaux d'expériences, nous avons utilisé 90 Souris âgées de

six à sept mois, mâles et femelles par moitié et provenant d'un même élevage. Nous les avons réparties en cinq lots :

1° Lot 1 (20 Souris), où chaque animal a reçu 1 cm³ de solution I.

2° Lot 2 (10 Souris), où chaque animal a reçu 1/4 de cm³ de solution II.

3° Lot 3 (20 Souris), où chaque animal a reçu 1 cm³ de solution III.

4° Lot 4 (20 Souris), où chaque animal a reçu 1 cm³ de solution IV.

5° Lot 5, témoin (20 Souris), où chaque animal a reçu 1 cm³ d'huile d'Olive neutralisée traitée par l'éther de pétrole dans les mêmes conditions que les solutions d'insaponifiable ou des fractions.

Les injections ont été faites sous la peau de la région dorsale, *en une seule fois*, pour éviter les phénomènes d'irritation dus à la répétition des piqûres.

Dans les lots 1, 2 et 4, nous avons eu à déplorer, dans les cinq premiers jours, des morts qui ne s'étaient pas produites dans nos expériences premières :

Cinq morts dans le lot 1, trois dans le lot 2 et neuf dans le lot 4.

Par ailleurs, les survivants dans le lot 4 et surtout dans le lot 1 ont fait des escarres très étendues, comme si les substances injectées possédaient une action nécrotique.

Pour interpréter les résultats à la fin de l'expérience, nous avons, suivant notre règle habituelle, éliminé les Souris mortes avant un an.

Dans ces conditions, nous avons obtenu :

— Dans le lot 1, sur 6 Souris survivantes, un sarcome sous-cutané dorsal postérieur, chez un mâle au 22e mois.

— Dans le lot 2, sur 2 Souris survivantes, aucune tumeur au bout de 17 à 18 mois, dates de la mort des animaux.

— Dans le lot 3, sur 13 Souris survivantes, 2 sarcomes :

L'un de la racine de la cuisse, chez un mâle au 14e mois.

L'autre thoracique au 15e mois, chez une femelle qui présentait un épithélioma glandulaire sous-cutané avec métastases.

— Dans le lot 4, sur 9 Souris survivantes, un petit fibrome thoracique de faible activité chez un mâle au 21e mois.

— Dans le lot 5 témoin, sur 12 Souris survivantes, aucune tumeur.

Il nous paraît intéressant de souligner que l'insaponifiable total du foie de sujets cancéreux apparaît, dans cette série d'expériences, beaucoup moins actif que dans nos expériences antérieures, puisque, sur 20 animaux, nous n'avons obtenu qu'un petit fibrome thoracique. Il est vrai que le haut pourcentage de morts dans les premiers jours de l'expérience (près de 50 %) enlève à notre expérimentation une grande partie de sa valeur.

Pour ce qui est des fractions, on voit que, si la fraction azotée précipitable par le sel de Reinecke ne manifeste pas de pouvoir cancérigène, en revanche, la fraction des stérols précipitables par le digitonoside et aussi la fraction privée à la fois des substances azotées et des stérols précipitables par le digitonoside, apparaissent susceptibles de provoquer des sarcomes après injection sous-cutanée chez la Souris.

Ce résultat tend à montrer que l'activité cancérigène des insaponifiables serait dûe non à une seule, mais à plusieurs substances actives dont tous nos efforts vont tendre à réaliser l'isolement.

B. Expérimentation sur le Rat

Nous avons expérimenté sur 40 Rats, âgés de six mois, par moitié mâles et femelles, et nous les avons répartis en quatre lots.

1° Lots 1 (10 Rats), où chaque animal a reçu une seule injection de 2 cm³ de la solution 1 (Stérols) préparée dans les mêmes conditions et à la même concentration que dans l'expérimentation sur la Souris. (Quantité totale de fraction stérolique injectée : 0 gr. 330.)

2° Lot 2 (10 Rats), où chaque animal a reçu une seule injection de 2 cm³ de solution huileuse de fraction III (Insaponifiable X). (Quantité totale injectée : 0 gr. 40.)

3° Lot 3 (10 Rats), où chaque animal a reçu 2 cm³ de solution huileuse d'insaponifiable total. (Quantité totale injectée : 0 gr. 40.)

4° Lot 4, témoin (10 Rats), où chaque animal a reçu 2 cm³ d'huile d'Olive neutralisée traitée par l'éther de pétrole dans les mêmes conditions que les solutions d'insaponifiables ou des fractions.

Les injections étaient faites sous la peau de la région dorsale.

Dans aucun des lots, nous n'avons obtenu de tumeurs. Ce résultat confirme la résistance du Rat, que nous avions déjà observée dans nos premières expériences, vis-à-vis de l'action cancérigène de l'insaponifiable du foie de sujets cancéreux.

CHAPITRE VI

LES SUBSTANCES CANCÉRIGÈNES ENDOGÈNES DANS LE SANG DES CANCÉREUX

La démonstration de l'activité cancérigène de l'insaponifiable d'organes de sujets cancéreux apporte, sans nul doute, un argument de poids à l'hypothèse de Cook et Kennaway, d'autant qu'il semble bien, puisque Steiner et Hieger ont trouvé actifs les insaponifiables de foies de sujets normaux, que la formation de substances cancérigènes ne soit pas la conséquence de l'état tumoral, mais le précède.

Mais ces substances, dont, si nous réussissons à en fixer la nature chimique, il restera à préciser les conditions de formation, doivent néces-

sairement, pour agir, être véhiculées par le sang. On doit donc pouvoir déceler dans ce liquide des fractions actives.

Aucune recherche n'a été, à notre connaissance, effectuée jusqu'alors dans ce sens. La raison en est simple. La matière première de la préparation de l'insaponifiable : le sang des cancéreux, ne se récolte pas à profusion. On ne peut songer, comme pour les organes, à effectuer les prélèvements sur le cadavre.

Nous nous sommes attaqués à ce problème de l'étude chimique et biologique de l'insaponifiable du sang des cancéreux, et, depuis plusieurs années, nous avons amassé patiemment les lipides totaux et la fraction insaponifiable qu'on en peut extraire, en opérant sur le sang de malades cancéreux choisis par un spécialiste éminent : le Professeur agrégé R. Huguenin, Directeur du Centre anti-cancéreux de l'Institut du Cancer.

Le fractionnement de cet insaponifiable est à peine commencé, de même que son expérimentation sur l'animal, du point de vue qui nous intéresse. Il était en effet nécessaire, avant d'entreprendre une telle étude, d'avoir à notre disposition une assez grande quantité de matière première.

En revanche, nous avons profité des manipulations obligatoires en vue de l'obtention de celle-ci, pour étudier, chez le cancéreux, le tableau des lipides totaux et des diverses fractions lipidiques, stéroliques en particulier, dont de très nombreux auteurs avaient signalé l'importance dans le métabolisme de l'organisme cancéreux.

Les résultats obtenus feront l'objet, en liaison avec Huguenin, de communications, où il sera tenu compte des facteurs cliniques et physiopathologiques. Nous ne les commenterons pas ici de ce point de vue, mais nous croyons utile de donner, pour chaque fraction, des conclusions générales qui se dégagent de nos recherches.

I. — LIPIDES TOTAUX

Leur dosage a été effectué par la méthode de Bloor, modifiée par Grigaut et Laudat.

Nous avons examiné 224 sujets cancéreux, sur lesquels nous avons effectué 336 dosages; 22 sujets où l'existence du cancer n'a pas été démontrée de façon irréfutable, sur lesquels nous avons effectué 27 examens; enfin, 18 sujets non cancéreux, mais soumis aux mêmes conditions d'existence et, en particulier, au même régime que les sujets cancéreux examinés.

Pour les sujets cancéreux, 22,3 % de nos dosages (75 cas) ont fourni des chiffres inférieurs à 5 gr. 50 par litre; 53,3 % (179 cas), des chiffres compris entre 5 gr. 50 et 7 gr. 50 par litre; 24,4 % (82 cas), des chiffres supérieurs à 7 gr. 50 par litre.

Pour les sujets douteux, 14,8 % (4 cas) de nos dosages ont fourni des chiffres inférieurs à 5 gr. 50 par litre; 51,8 % (14 cas), des chiffres compris entre 5 gr. 50 et 7 gr. 50 par litre; 33,3 % (9 cas), des chiffres supérieurs à 7 gr. 50 par litre.

Pour les sujets non cancéreux, 33,3 % (6 cas) de nos dosages ont fourni des chiffres inférieurs à 5 gr. 50 par litre; 55,5 % (10 cas), des chiffres compris entre 5 gr. 50 et 7 gr. 50 par litre; et 11,1 % (2 cas), des chiffres supérieurs à 7 gr. 50 par litre.

Le taux des lipides totaux chez les cancéreux subit donc des variations qui ne paraissent avoir aucun rapport avec le cancer en lui-même.

II. — ACIDES GRAS

Ils ont été dosés par la méthode de Lemeland (236), modifiée en ce qui concerne l'extraction des lipides totaux.

Nous avons examiné 204 sujets cancéreux, sur lesquels nous avons effectué 285 dosages; 18 sujets douteux, sur lesquels nous avons pratiqué 23 examens; enfin, 16 sujets non cancéreux, sur lesquels nous avons pratiqué 16 examens.

Pour les sujets cancéreux, 34,4 % (98 cas) ont donné des chiffres inférieurs à 3 gr. 30 par litre; 44,9 % (128 cas) ont donné des chiffres compris entre 3 gr. 30 et 4 gr. 60 par litre; 20,7 % (59 cas), des chiffres supérieurs à 4 gr. 60 par litre.

Pour les sujets douteux, 17,4 % des cas ont fourni des chiffres inférieurs à 3 gr. 30 par litre (4 cas); 43,5 % (10 cas), des chiffres compris entre 3 gr. 30 et 4 gr. 60 par litre; 39,1 % (9 cas), des chiffres supérieurs à 4 gr. 60 par litre.

Pour les sujets non cancéreux, 43,7 % (7 cas) ont fourni des chiffres inférieurs à 3 gr. 30 par litre; 43,7 % (7 cas), des chiffres compris entre 3 gr. 30 et 4 gr. 60 par litre; 12,5 % (2 cas), des chiffres supérieurs à 4 gr. 60 par litre.

Comme dans le cas des lipides totaux, on ne peut établir aucune corrélation entre le taux des acides gras du sang et l'existence ou le degré de malignité des cancers.

Cette conclusion s'oppose à celles de nombreux auteurs et en particulier de Reding, Joukowsky et Timmerman (302), qui signalent une chute constante de la teneur en acides gras, de l'ordre de 20 à 30 %, chez les cancéreux.

III. — CHOLESTÉROL

La question du taux de cholestérol dans les humeurs des sujets cancéreux a fait l'objet de très nombreuses publications. Beaucoup d'auteurs et, en particulier, Roffo (316), pensent que le cholestérol joue un rôle

très important dans la pathogénie des tumeurs et la constitution du terrain cancéreux. Il interviendrait, selon eux, comme agent favorisant la multiplication des cellules cancéreuses. Le meilleur terrain pour le développement du cancer expérimental serait celui de l'animal hypercholestériné, du fait du régime ou d'influences extérieures, telles que les radiations solaires ou les ultra-violets. C'est ainsi que le cholestérol aurait un rôle favorisant sur la croissance des tumeurs greffées (318). Rusch, Bowman et Kline (326) signalent d'autre part l'effet favorable d'applications cutanées de cholestérol en solution huileuse sur le développement des tumeurs de la peau sous l'influence des ultra-violets ou du benzopyrène. D'autre part, Robertson et Bornet (308) ont signalé, dans des expériences déjà anciennes, que l'injection de cholestérol directement au sein des tumeurs provoquait une accélération marquée de leur croissance et de l'appartion de métastases. On sait par ailleurs que, dans l'espèce humaine, chez les enfants et les vieillards qui présentent en général des taux de cholestérol plutôt bas, la croissance des tumeurs est lente. Au contraire, c'est vers 45 à 50 ans, âge aux environs duquel le cancer est le plus fréquent, que la cholestérolémie atteint en général son maximum.

Sans nous attarder sur ce sujet qui remplirait des volumes, et qui a fait l'objet de monographies très documentées, en particulier celle de Trappe (381), où l'auteur envisage également les autres fractions lipidiques, nous signalerons que tous les auteurs sont loin d'être d'accord sur l'existence d'une hypercholestérolémie chez le cancéreux.

Personnellement, nous avons examiné 259 sujets cancéreux, sur lesquels nous avons pratiqué 398 dosages; 26 sujets douteux, sur lesquels nous avons effectué 35 dosages, et 18 sujets non cancéreux, pour lesquels nous avons effectué 18 dosages.

1° Pour les sujets cancéreux, 5,2 % (21 cas) ont fourni des chiffres inférieurs à 1 gr. 50 par litre; 31,4 % (125 cas), des chiffres compris entre 1 gr. 50 et 2 gr.; et 63,3 % (252 cas), des chiffres supérieurs à 2 gr.

2° Pour les sujets douteux, 6,4 % (2 cas) ont fourni des chiffres inférieurs à 1 gr. 50; 22,5 % (7 cas), des chiffres compris entre 1 gr. 50 et 2 gr.; 70,9 (22 cas), des chiffres supérieurs à 2 gr.

3° Pour les sujets non cancéreux, 50 % (9 cas) ont fourni des chiffres compris entre 1 gr. 50 et 2 gr.; et 50 %, des chiffres supérieurs à 2 gr.

Le dosage du cholestérol estérifié a donné les résultats suivants :

1° Pour 244 sujets cancéreux, sur lesquels furent effectués 374 dosages, 9,8 % (37 cas) ont fourni des chiffres inférieurs à 1 gr. 10; 33,1 % (124 cas), des chiffres compris entre 1 gr. 10 et 1 gr. 60; 56,9 % (213 cas), des chiffres supérieurs à 1 gr. 60.

Parallèlement, 22,5 % (84 cas) ont fourni des chiffres de cholestérol

libre inférieurs à 0 gr. 30; 34,5 % (129 cas), des chiffres compris entre 0 gr. 30 et 0 gr. 50; 43 % (161 cas), des chiffres suprieurs à 0 gr. 50.

2° Pour 25 sujets douteux, 13,3 % (4 cas) ont fourni des chiffres de cholestérol estérifié inférieurs à 1 gr. 10; 40 % (12 cas), des chiffres compris entre 1 gr. 10 et 1 gr. 60; 46,6 % (14 cas), des chiffres supérieurs à 1 gr. 60.

Parallèlement, 16,6 % (5 cas) ont donné des chiffres de cholestérol libre inférieurs à 0 gr. 30; 33,3 % (10 cas), des chiffres compris entre 0 gr. 30 et 0 gr. 50; 50 % (15 cas), des chiffres supérieurs à 0 gr. 50.

3° Pour 9 sujets non cancéreux, 44,4 % (4 cas) ont fourni des chiffres de cholestérol estérifié compris entre 1 gr. 10 et 1 gr. 60; 55,5 % (5 cas), des chiffres supérieurs à 1 gr. 60; parallèlement, 22,2 % (2 cas) ont donné des chiffres de cholestérol libre inférieurs à 0 gr. 30; 44,4 % (4 cas), des chiffres compris entre 0 gr. 30 et 0 gr. 50; 33,3 % (3 cas), des chiffres supérieurs à 0 gr. 50.

En conclusion, dans la majorité des cas (65,3 % sur 398 dosages), le cholestérol total se trouve augmenté chez les sujets cancéreux, spécialement sous sa forme estérifiée, d'où augmentation fréquente du rapport cholestérol estérifié-cholestérol total; mais il faut bien noter que cette variation n'est pas constante et qu'elle n'est pas liée de façon systématique au cancer.

IV. — INSAPONIFIABLE

L'insaponifiable total a été dosé, en même temps que les acides gras, par la méthode de Lemeland. Seulement, étant donné que son dosage n'était qu'un prélude à l'étude chimique et biologique de cette fraction, nous avons pris grand soin d'éviter, dans l'évaporation des extractums éthéropétroliques, toutes les circonstances pouvant donner lieu à des altérations et, en particulier, tout contact prolongé avec l'oxygène de l'air et tout chauffage au-dessus de 50°. Lors de la saponification, la température est bien aux environs de 100°, mais son action néfaste est alors beaucoup moins à craindre qu'au moment de l'évaporation des solutions éthéropétroliques d'insaponifiable, où ce dernier risque de se trouver en contact avec l'oxygène de l'air sur une large surface et en l'absence de substances protectrices du type des acides gras à liaisons éthyléniques.

Nous avons examiné 204 sujets cancéreux, sur lesquels nous avons pratiqué 284 dosages; 18 sujets douteux, sur lesquels nous avons pratiqué 23 dosages; et enfin 16 sujets non cancéreux, avec 16 dosages.

1° Pour les sujets cancéreux, 5,6 % (16 cas) ont fourni des chiffres inférieurs à 1 gr. 90 par litre; 57,4 % (163 cas), des chiffres compris entre 1 gr. 90 et 2 gr. 90; 36,9 % (105 cas), des chiffres supérieurs à 2 gr. 90.

2° Pour les sujets douteux, 4,43 % (1 cas) ont fourni des chiffres inférieurs à 1 gr. 90; 69,5 % (16 cas), des chiffres compris entre 1 gr. 90 et 2 gr. 90; 26,1 % (6 cas), des chiffres supérieurs à 2 gr. 90.

3° Pour les sujets normaux, 75 % (12 cas) ont fourni des chiffres compris entre 1 gr. 90 et 2 gr. 90; 25 % (4 cas), des chiffres supérieurs à 2 gr. 90.

On peut conclure, et cela était prévisible étant donné les résultats obtenus dans les dosages du cholestérol, que le taux d'insaponifiable du sang chez les cancéreux est assez fréquemment au-dessus de la normale.

Il nous reste à étudier qualitativement cet insaponifiable, à la fois du point de vue chimique et du point de vue biologique, et ce double problème constitue l'objet de nos recherches actuellement en cours.

Nous pouvons espérer en obtenir des résultats intéressants. Déjà, Dobriner, Rhoads, Liebermann, Hill et Fieser (100), ont montré l'existence, dans l'urine des cancéreux, par l'utilisation combinée des réactifs chimiques, de la chromotographie et de la spectrographie dans l'infra-rouge, d'α cétostéroïdes anormaux (Δ. 9. étiocholénol-3. α one 17 en particulier) et on peut conclure que ce qui importe, ce n'est pas le taux des stérols et de leurs dérivés dans les humeurs et les tissus de sujets cancéreux, mais bien plutôt le métabolisme de ces substances qui apparaît profondément perturbé au cours du cancer.

CONCLUSIONS

On connaît à l'heure actuelle de nombreuses substances chimiques douées d'activité cancérigène. Nous avons fait le point de la question et nous avons apporté notre contribution personnelle à la discussion de leur mécanisme d'action, sur lequel, d'ailleurs, la lumière est encore loin d'être faite.

Nous avons expérimenté avec un de ces agents cancérigènes choisi parmi les plus actifs : le 3.4. benzopyrène. Nous avons commencé par en faire la synthèse, et ce travail chimique nous a permis d'apporter des perfectionnements aux méthodes connues, aussi bien dans le domaine de la synthèse proprement dite que dans celui de la purification par chromatographie sur une alumine activée, dont les conditions de préparation ont été mises au point par nous.

Nous avons ensuite étudié les modalités de l'action cancérigène du 3.4. benzopyrène chez diverses espèces animales (Souris, Rat, Poule, Lapin, Cobaye), souligné l'importance de la technique utilisée et montré que la Souris était l'animal le plus réceptif aussi bien vis-à-vis des badigeonnages de la peau que des injections dans le tissu conjonctif; le Cobaye étant, au contraire, très résistant. Nous avons démontré, en outre, la résistance à la cancérisation de certains tissus et, en particulier, de la muqueuse de l'estomac.

Nous avons également étudié l'influence du solvant et de la concentration en substance active et précisé les doses limites suffisantes pour provoquer la cancérisation, que nous avons montré être très minimes.

Nous avons enfin mis en évidence que les produits intermédiaires dans la synthèse du 3.4 benzopyrène à partir du pyrène : l'acide β 3. pyrénoylproprionique, l'acide γ 3. pyrénylbutyrique, et surtout le 1'. céto 1' 2' 3' 4' tétrahydrobenzopyrène, étaient dépourvus d'activité cancérigène.

Des essais sur les tissus végétaux (Carotte), cultivés *in vitro,* ne nous ont pas permis d'obtenir de transformation maligne.

Enfin, nous avons montré que la théorie de Wood et Fieser, ramenant l'action cancérigène du 3.4. benzopyrène, comme d'ailleurs celle des autres carbures cancérigènes, à une libération de substances à groupe- — SH à partir des protéïdes tissulaires, ne cadrait pas avec les faits observés par nous : taux de glutathion abaissé dans le sang des cancéreux — absence d'anomalies provoquées par le glutathion et ses acides aminés constitutifs sur les cellules en culture — absence de libération de groupements — SH dans l'action du 3.4. benzopyrène et de deux autres carbures cancérigènes sur le sang, additionné ou non de cystine.

***

Abordant le problème des rapports entre l'alimentation et le cancer, nous y avons apporté une triple contribution :

1° La théorie de Delbet, attribuant le développement du cancer à une carence en Magnésium, ne nous paraît pas exacte, car le dosage de cet élément dans le sang de nombreux sujets cancéreux n'a pas révélé de déficience systématique. Nous avons montré qu'il en était de même pour le Calcium et, par ailleurs, qu'il n'y avait, chez les cancéreux, aucune corrélation entre l'activité phosphatasique alcaline et le taux de Magnésium du sang.

2° Nous avons montré que l'Huile de germe de Blé ne possède pas l'activité cancérigène qui lui avait été attribuée par les auteurs américains.

3° Nous avons constaté l'absence d'action cancérigène d'une substance auxinique de synthèse : l'acide α naphtylacétique, qui nous avait permis d'obtenir des tumeurs chez les Végétaux. Il est ainsi intéressant d'opposer, du point de vue de leur action chez les deux grandes classes d'Etres vivants, le 3.4. benzopyrène et, d'une façon générale, les carbures cancérigènes aux substances auxiniques ou hormones de croissance végétale.

***

Nous avons, enfin, attaqué le très important problème de la production possible de substances cancérigènes au sein même de l'organisme (hypothèse de Cook et Kennaway).

Après avoir posé le problème et discuté, de manière approfondie, les diverses directions dans lesquelles on peut essayer de le résoudre, nous y avons apporté une double contribution personnelle :

1° Nous avons montré que l'irradiation, en solution benzénique, d'un cholestérol spécialement purifié par nous, avec de fortes doses de rayons X, ne provoquait, dans les conditions de nos expériences, aucune modification de ses propriétés physiques et chimiques. L'expérimentation sur l'animal du produit ainsi irradié n'a pas conduit à la production de tumeurs. Il semble donc logique de conclure que le mécanisme de la production du cancer par les rayons X ne peut être ramené, comme cela

avait été prétendu, à une transformation chimique portant sur le cholestérol.

2° Dans une deuxième série de recherches, beaucoup plus importantes si l'on en juge par l'écho qu'elles ont éveillé dans les milieux scientifiques internationaux, nous avons démontré l'action cancérigène, en injection à la Souris (le Rat apparaît réfractaire), de l'insaponifiable du foie de sujets cancéreux, action que n'a jamais manifestée, dans nos expériences, l'insaponifiable du foie de sujets non cancéreux.

Après l'expérimentation de cet insaponifiable sur les cellules en culture, expérimentation qui nous a montré l'absence de phénomènes de cancérisation et seulement la production de quelques anomalies nucléaires, nous l'avons ensuite étudié physiquement et chimiquement.

Nous avons vu que son spectre de fluorescence ne ressemblait pas à celui, si typique, des carbures cancérigènes.

L'utilisation des solvants et de la méthode d'adsorption chromatographique nous a permis d'isoler quelques fractions, dont l'étude chimique et biologique reste à faire. En tout cas, l'application de la chromatographie nous a permis de poser un certain nombre de règles importantes pour la continuation de nos recherches.

Nous avons, en outre, procédé à un premier fractionnement chimique, en utilisant le digitonoside et le sel de Reinecke, ce qui nous a permis d'isoler trois fractions :

1° Fraction I, renfermant les stérols précipitables par le digitonoside.

2° Fraction II, renfermant les substances azotées précipitables par le sel de Reinecke.

3° Fraction III (insaponifiable X) renfermant les substances restant dans l'insaponifiable, après l'action successive du digitonoside et du sel de Reinecke.

Dans la fraction azotée, nous avons pu isoler une petite quantité d'un monophosphodiaminolipide : la lignocérylsphingomyéline, que nous avons identifiée par la microanalyse et le dédoublement en lignocérylsphingosine, puis en acide lignocérique et en sphingosine.

L'essai sur la Souris (Rat toujours réfractaire) des trois fractions obtenues nous a montré que, si les fractions azotées, précipitables par le sel de Reinecke, ne présentent pas d'activité cancérigène, en revanche, la fraction des stérols précipitables par le digitonoside, et aussi la fraction privée à la fois des substances azotées précipitables par le sel de Reinecke et des stérols précipitables par le digitonoside, possèdent cette activité. Ces résultats nous permettent de conclure qu'il doit exister, dans l'insaponifiable du foie de sujet cancéreux plusieurs substances douées d'activité cancérigène.

Enfin, nous avons commencé le travail d'isolement de fractions cancérigènes à partir du sang de cancéreux et les techniques utilisées nous ont permis d'en profiter pour étudier les taux, chez les cancéreux, des diverses fractions lipidiques, et montrer que ces taux, particulièrement ceux du cholestérol, auquel beaucoup d'auteurs font jouer un rôle très important dans la genèse du cancer, n'ont pas une relation aussi systématique avec l'état cancéreux que le prétendaient jusqu'ici la plupart des cancérologues.

Vu : *Le Président de Thèse,*
R. Fabre.

Vu : *Le Doyen de la Faculté de Pharmacie,*
R. Fabre.

Vu et permis d'imprimer :
Le Doyen de la Faculté des Sciences
faisant fonction de Recteur de l'Université de Paris,
J. Cabannes.

BIBLIOGRAPHIE

(1) ADAMSTONE (F. B.). — *Science*, 1934, *80*, 450 ; et *Am. J. Cancer*, 1936, *28*, 540.

(2) ANDERVONT (H. B.). — *U. S. Pub. Health. Rept.*, 1939, *54*, 1529 et 1986.

ANDERVONT (H. B.) et EDWARDS (J. E.). — *J. Nat. Cancer Inst.*, 1941, *2*, 139 ; et 1943, *3*, 349-355.

ANDERVONT (H. B.), GRADY (H. G.) et EDWARDS (J. E.). — *J. Nat. Cancer Inst.*, 1942, *3*, 131.

(3) ANDERVONT (H. B.) et MACELENEY (W. T.). — *U. S. Pub. Health. Rept.*, 1939, *54*, 1597.

(4) ANISSIMOVA (V.). — *Am. J. Cancer*, 1939, *36*, 229-232.

(5) APTEKMAN (P. M.), KING (H. D.) et LEWIS (M. R.). — *Cancer Research* 1943, *3*, 856-857.

(6) ARMSTRONG (E. C.) et BONSER (G. M.). — *J. Path. a. Bact.*, 1944, *56*, 507.

(7) AUCHINCLOSS (R.) et HAAGENSEN (C. D.). — *Proc. Soc. f. Exp. Biol. a. Med.*, 1939, *42*, 703-705.

(8) BABLET (J.) et BADER (H.). — *Bull. Assoc. Franç. Etude Cancer*, 1932, *21*, 570-573.

(9) BACHMANN (W. E.), COOK (J. W.), DANSI (A.), DE WORMS (C. G. M.), HASLEWOOD (G. A. D.), HEWETT (C. L.) et ROBINSON (Mrs. A. M.). — *Proc. Roy. Soc.* (B.), 1937, *123*, 343-368.

(10) BACHMANN (W. E.) et CHEMERDA (J. M.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1938, *60*, 1023-1026.

(11) BACHMANN (W. E.), KENNEWAY (E. L.) et KENNEWAY (N. M.). — *Yale J. Biol. a. Med.*, 1938, *11*, 97.

(12) BACQ (Z. M.). — *Travaux récents sur les toxiques de guerre. — Actualités biochimiques.* (Masson, Paris, 1947.)

(13) BADGER (G. M.), COOK (J. W.), HEWETT (C. L.), KENNAWAY (E. L.), KENNAWAY (N. M.) et MARTIN (R. H.). — *Proc. Roy. Soc.* (B), 1942, *131*, 170.

(14) BADGER (G. M.), COOK (J. W.), HEWETT (C. L.), KENNAWAY (E. L.), KENNAWAY (N. M.), MARTIN (R. H.) et ROBINSON (A. M.). — *Proc. Roy. Soc.* (B.), 1940, *129*, 439 ; et 1942, *131*, 170.

(15) BAGG (H. J.). — *Am. J. Cancer*, 1936, *26*, 69-84.

(16) BARRY (G.), COOK (J. W.), HASLEWOOD (G. A. D.), HEWETT (C. L.), HIEGER (I.) et KENNAWAY (E. L.). — *Proc. Roy. Soc.* (B.), 1935, *117*, 318-351.

(17) BARRY (G.) et COOK (J. W.). — *Am. J. Cancer*, 1934, *20*, 58.

(18) BECK (S.). — *Brit. J. Exp. Path.*, 1941, *22*, 299-302.

(19) BEEBE (S. P.). — *Am. J. Physiol.*, 1904, *12*, 167-172.

(20) BEREGOFF (P.). — *J. Cancer Research*, 1930, *14*, 559-567.

(21) BERENBLUM (L.), CROWFOOT (D.), HOLIDAY (E. R.), SCHŒNTAL (R.). — *Cancer Research*, 1943, *3*, 151.

(22) Berenblum (L.) et Schœntal (R.). — *Nature* (London), 1942, *149*, 439-440; et *Cancer Research*, 1943, *3*, 145-150.
(23) Bergman (E.) et Hirshberg (Y.). — *Nature* (London), 1938, *142*, 1037.
(24) Bergmann (W.), Stavely (H. E.), Strong (L. C.) et Smith (G. M.). — *Am. J. Cancer*, 1940, *38*, 81-85.
(25) Bergmann (W.). — *J. Biol. Chem.*, 1940, *132*, 471-472.
(26) Bernhard (K.). — *Ztschr. f. Physiol. Chem.*, 1937, *248*, 256-276; et *Helvetica*, 1945, *28*, 1697-1707.
(27) Bersin (Th.). — *Die Méthode der Enzymforschung;* Thieme, Leipzig, 1941, *3*, 2636.
(28) Beuthin (W.). — *Ztschr. f. Krebsforsch.*, 1911, *10*, 227.
(29) Bielschowsky (F.). — *Brit. J. Exp. Path.*, 1944, *25*, 1; 1946, *27*, 54.
(30) Bielschowsky (F.). — *Brit. J. Exp. Path.*, 1945, *26*, 270; *Biochem. J.*, 1945, *39*, 287.
(31) Binet (L.) et Weller (G.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1946, *28*, 751-757.
(32) Binet (L.) et Weller (G.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1934, *16*, 1284-1296.
(33) Bisceglie (V.). — *Arch. f. Exper. Zellforsch.*, 1928, *6*, 161-172.
(34) Bittner (J.). — *Am. J. Cancer*, 1936, *25*, 113-614; et 1939, *36*, 44. — *J. Heredity*, 1937, *28*, 363. — *U. S. Pub. Health. Rept.*, 1939, *54*, 1590 et 1827. — *Proc. Soc. f. Exp. Biol. a. Med.*, 1940, *45*, 805-810. — *Science*, 1941, *93*, 527-528.
(35) Blum (L.) et Klotz (A.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1923, *89*, 1385-1386.
(36) Blumberg (H.). — *U. S. Pub. Health. Rept.*, 1940, *55*, 531-537.
(37) Bolaffi (A.). — *Tumori*, 1930, *14*, 201-211 et 420. — *Biochem. et Sper.*, 1931, *18*, 77-91.
(38) Bonn (C.). — *Am. J. Cancer*, 1937, *30*, 437-454.
(39) Bonser (G. M.). — *J. Path. a. Bact.*, 1943, *55*, 1-6.
(40) Bonser (G. M.). — *J. Path. a. Bact.*, 1935, *41*, 217.
(41) Bottomley (A. C.) et Twort (C. C.). — *Am. J. Cancer*, 1934, *20*, 781.
(42) Bowman (R. O.), Pitts (H. C.), Mitchell (P. H.) et Ewertz (E.). — *Canad. Med. Assoc. J.*, 1936, *34*, 527-537.
(43) Bowman (R. O.) et Mottschaw (H. R.). — *Cancer Research*, 1941, *1*, 308-309.
(44) Boyland (E.), Levi (A. A.), Mawson (E. H.) et Roe (E). — *Biochem. J.*, 1941, *35*, 184-191.
(45) Boyland (E.) et Brues (A. M.). — *Proc. Roy. Soc.* (B.), 1937, *122*, 429-441.
(46) Boyland (E.) et Mawson (E. H.). — *Biochem. J.*, 1938, *32*, 1460.
(47) Braier (B.). — *Am. J. Cancer*, 1934, *20*, 146; et *Semana Med.*, 1933, *60*, 2006.
(48) Braun (A. C.) et Laskaris (T.). — *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1942, *28*, 468-477.
(49) Brikker (L.) et Timofejewa (L.). — *Klin. Med.* (U.R.S.S.), 1937, *15*, 553-554.
(50) Browning (C. H.), Cohen (J. B.), Cooper (K. E.), Ellingworth (S.) et Gulbransen (R.). — *Proc. Roy. Soc.* (B.), 1933, *113*, 300. — III° Internat. Cancer Congress. Atlantic City, 1939.
(51) Browning (C. H.), Gulbransen (R.) et Niven (J. S. F.). — *J. Path. a. Bact.*, 1936, *42*, 155.
(52) Brues (A. M.), Marble (B. B.) et Riegel (B.). — *Cancer Research.*, 1941, *1*, 815-817.

(53) Brumpt (E.). — *Bull. Acad. Méd.*, 1931, *105*, 908-924, et *106*, 292-305; et 1936, *115*, 400-415.
(54) Bucher (O.). — *Ztschr. f. Zellforsch.*, 1940, *30*, 438.
(55) Burrows (H.), Hieger (I.) et Kennaway (E. L.). — *J. Path. a. Bact.*, 1936, *43*, 419.
(56) Burrows (H.). — *Am. J. Cancer*, 1935, *24*, 613.
(57) Burrows (H.) et Mayneord (W. V.). — *Am. J. Cancer*, 1937, *31*, 484-485.
(58) Buser (P.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1945, *139*, 6-7.
(59) Butenandt (A.). — *Neuere Beiträge der Biologischen Chemie zum Krebsproblem In.* « *Chemie Und Krebs* ». Berlin, 1940, 27-50; et *Angewandte Chemie*, 1940, *53*, 345-351.
(60) Butenandt (A.) et Danneberg (H.). — *Naturwissenschaften*, 1942, *30*, 52 et 583-586.
(61) Butenandt (A.) et Kudfuss (H.). — *Ztschr. f. Physiol. Chem*, 1938, *253*, I-III.
(62) Buu-Hoï (N. P.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1943, *137*, 725-727.
(63) Buvat (R.). — *C. R. Acad. Sciences*, 1942, *214*, 128-130.
(64) Carrel (A.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1925, *93*, 1083-1085.
(65) Carruthers (C.). — *Proc. Soc. f. Exp. Biol. a. Med.*, 1939, *40*, 107-108.
(66) Cavers (F.). — *Cancer Rev.*, 1932, *7*, 373.
(67) Chalmers (J. G.). — *Chem. Ind.* (London), 1941, *60*, 618.
(67 bis) Chalmers (J. G.) et Crowfoot (D.). — *Biochem. J.*, 1941, *35*, 70-75.
(68) Chevallier (A.), Denoix (P.) et Manuel (S.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1945, *139*, 598-599; et *Bull. Assoc. Franç. Etude Cancer*, 1946, *33*, 222-238.
(69) Christensen (O. T.). — *J. Prakt. Chem.*, 1892, *45*, 213-216 et 356-376.
(70) Cilotti (M.). — *Pathologica*, 1931, *23*, 535; et *Cancer Rev.*, 1932, *7*, 276.
(71) Clar (J.). — *Berichte*, 1929, *62*, 350-359.
(72) Clowes (G. H. A.) et Fribie (W. S.). — *Am. J. Physiol*, 1905, *14*, 173-192.
(73) Cohen (P. P.), Hekhuis (G. L.) et Sober (E. K.). — *Cancer Research*, 1942, *2*, 405-410.
(74) Collins (V. J.), Gardner (W. U.) et Strong (L. C.). — *Cancer Research*, 1943, *3*, 29-35.
(75) Cook (J. W.). — *J. Chem. Soc.* (London), 1931, *134*, 487-489; 489-499; 499-507; 2012-2018; 2524-2528; 2529-2532 et 3273-3279.
(76) Cook (J. W.) Hieger (I.), Kennaway (E. L.) et Mayneord (W. V.). — *Proc. Roy. Soc.* (B.), 1932, *111*, 455-484.
(77) Cook (J. W.), Hewett (C. L.) et Hieger (I.). — *J. Chem. Soc.* (London), 1933, *136*, 395-398.
(78) Cook (J. W.) et Haslewood (G. A. D.). — *J. Chem. Soc.* (London), 1934, *137*, 428-433.
(79) Cook (J. W.), Hewett (C. L.), Kennaway (E. L.) et Kennaway (N. M.). — *Am. J. Cancer*, 1940, *40*, 62.
(80) Cook (J. W.) et Hewett (C. L.). — *J. Chem. Soc.*, 1933, *136*, 398-405.
(81) Cook (J. W.), Kennaway (E. L.) et Kennaway (N. M.). — *Nature* (London), 1940, *145*, 627.
(82) Cori (C. F.). — *J. Exp. Med.*, 1927, *45*, 983.
(83) Crabtree (H. G.). — *Cancer Research*, 1944, *4*, 688; 1945, *5*, 345; et 1946, *6*, 553.

(84) Craciun (E. C.), Zugravescu (I.), Ursu (A.) et Manolescu Motoc (F.). — *Bull. Sect. Sc. Acad. Roum.*, 1940, *23*, 36-47.

(85) Cramer (W.) et Horning (E. S.). — *Lancet*, 1936, *230*, 247.

(86) Creech (M. H.). — *Am. J. Cancer*, 1939, *35*, 191; et 1940, *39*, 149-160.

(87) Curshmann. — *Zentr. f. Gewebehyg.*, 1920, *8*, 145.

(88) Daudel (R.) et Mme Pullman (A.). — *C. R. Acad. Sciences*, 1945, *220*, 888-889.

Daudel (R.). — *Revue Scientifique*, 1946, *84*, 37-42 et 229-230.

(89) Davidson (J. R.). — *Canad. Med. Assoc. J.*, 1934, *31*, 486; et 1935, *32*, 364.

(90) De Fermo (C.). — *Minerva Med.* (Turin), 1930, *21*, 864-867.

(91) De Ome (K. B.), Strait (A.) et MacCawley (L. L.). — *Science*, 1942, *96*, 301-302.

(92) Delbet (P.) et Palios (C.). — *Bull. Assoc. Franç. Etude Cancer*, 1928, *17*, 315-323 et 525; 1930, *19*, 315; et 1931, *20*, 187-190. — *Bull. Acad. Méd.*, 1931, *105*, 508.

Delbet (P.) et Godard (H.). — *Bull. Assoc. Franç. Etude Cancer*, 1928, *17*, 347.

Id. et Palios (C.). — *Ibidem*, 1928, *17*, 515-524.

Delbet (P.). — *Ibidem*, 1930, *19*, 175; 1932, *21*, 554.

Id. et Franicevic. — *Ibidem*, 1930, *19*, 742. — Delbet (P.) et Robinet (L.), *Bull. Acad. Méd.*, 1934, *111*, 415-429. — Nombreuses autres communications; cf. Delbet (P.), *Politique préventive du Cancer*. (Denoël, Paris, 1944.)

(93) Des Ligneris (M. J. A.). — *Am. J. Cancer*, 1940, *39*, 489-490.

(94) Des Ligneris (M. J. A.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1935, *120*, 777-780; et 1936, *121*, 1579-1581.

(95) Dickens (F.). — *Nature* (London), 1947, *159*, 839.

(96) Di Grazia (A.) et Rasa (G.). — *Vitaminologia*, 1942, *1*, 297.

(97) Dittmar (C.). — *Ztschr. f. Krebsforsch.*, 1942, *52*, 17.

(98) Dittmar (C.) et Burschkies (C.). — *Ztschr, f. Krebsforsch.*, 1939, *49*, 379-381.

(99) Dobriner (K.), Rhoads (C. P.) et Lavin (G. I.). — *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.*, 1939, *41*, 67. — *Cancer Research*, 1942, *2*, 95-107.

(100) Dobriner (K.), Rhoads (C. P.), Liebermann (S.), Hill (B. R.) et Fieser (L. F.). — *Science*, 1944, *99*, 494, et 4th Internat. Cancer Congress; Saint-Louis; Missouri; U. S. A., 2-7 septembre 1947. — Cf. également Greenstein (J. P.). — *Biochemistry of Cancer* (New-York, 1947).

(101) Dobrowolskaïa-Zavadskaïa (N.). — *C. R. Soc. Biol*, 1936, *120*, 1055-1057.

(102) Dobrowolskïa-Zavadskaïa (N.) et Adamova (N.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1945, *139*, 551-553.

(103) Dodds (E. C.), Lawson (W.) et Williams (P. C.). — *Nature* (London), 1941, *148*, 142.

(104) Dodds (E. C.), Goldberg (L.), Lawson (W.) et Robinson (R.). — *Nature* (London), 1938, *141*, 247-248.

(105) Dognon (A.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1926, *95*, 1433-1434.

(106) Dolbey (R. V.) et Mooto (A. W.). — *Lancet*, 1924, 587.

(107) Domagk (G.). — *Ztschr. f. Krebsforsch.*, 1939, *48*, 283-297.

(108) Dorrance (G. M.) et Ciccone (E. F.). — *Proc. Soc. f. Exp. Biol. a. Med.*, 1937, *36*, 426-427.

(109) Druckrey (H.), Richter (R.) et Vierthaler (R.). — *Naturwissenschaften*, 1941, *29*, 63-69; et *Klin. Wochs*, 1941, *20*, 781-785.

(110) Dubard. — *Bull. Acad. Med.* 1918, *79*, 295-29 et *Bull. Assoc. Franç. Etude Cancer*, 1919, *8*, 148-158 et 1920, *9*, 370-384 et *Arch. mal. app. dig*, 1931, *21*, 546-557.
(111) Dunlap (C. E.) et Warren (S.). — *Cancer Research*, 1941, *1*, 953-954.
(112) Dunlap (C. E.) et Warren (S.). — *Cancer Research*, 1943, *3*, 606-607.
(113) Dyer (M.) et Roe (J. H.). — *J. Cancer Research*, 1930, *14*, 301, 305, et *Am. J. Cancer*, 1935, *18*, 888-898.
(114) Earle (W. R.) et Voegtlin (C.). — *Am. J. Cancer*, 1938, *34*, 373.
(115) Eicholtz (F.). — *Biochem. Ztschr*, 1931, *235*, 170-173.
(116) Engel (P.). — *Arch. Int. Pharm. a. Ther*, 1941, *65*, 101-10.
(117) Erdtman (H.). — *Ztschr. f. Physiol. Chem.*, 1927, *172*, 182-198, 1928, *177*, 211-220 et 231-236.
(118) Evans (S. M.), Emerson (O. H.) et Emerson (G. A.). — *J. Biol. Chem.* 1936, *113*, 319-322.
(119) Falin (L. I.) et Gromzewa (K. E.). — *Am. J. Cancer*, 1939, *36*, 233-236.
(120) Figiber (J.) et Bang (F.). — *Bull. Acad. Roy. Sci. et Lett. Danemark*, 1921, *3*, 1-40.
(121) Fieser (L. F.) et Newman (M. S.). — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1935, *57*, 961 et 1936, *58*, 2376-2382.
(122) Fieser (L. F.), Fieser (M.), Hershberg (E. B.), Newman (M. S.), Seligman (A. M.) et Shear (M. J.). — *Am. J. Cancer* 1937, *29*, 260.
(123) Fieser (L. F.) et Hershberg (E. B.). — *J. Am. Chem. Soc.* 1940, *62*, 1640.
(124) Fieser (L. F.) et Campbell (W. P.). — *J. Am. Chem. Soc.* 1938, *60*, 1142-1145.
(125) Fieser (L. F.). — *Am. J. Cancer*, 1938, *34*, 36.
(126) Fieser (L. F.) et Fieser (M.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1935, *57*, 782-783.
(127) Fischer (B.). — *Münch. Med. Wschr*, 1906, *50*, 2041..
(128) Fischer (A.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1926, *94*, 1217-1218 ; *Klin. Voch.* 1937, *6*, 698.
(129) Franicevic (N.) et Stanoyevitch (L.). — *Acta Cancrol.*, 1936, *11*, 123-124.
(130) Frankel (E.) et Bielschowsky (F.). — *Ztschr. f. Physiol. Chem.* 1932, *213*, 58-63.
(131) Franseen (C. C.) et Taylor (G. W.). — *Am. J. Cancer*, 1934, *22*, 287.
(132) Friedlich (W). et Koyenuma (N.). — *Naturwissenschaften*, 1942, *30*, 145-146.
(133) Friedrich-Freksa (H.). — Cité par Butenandt (61).
(134) Friley (M.) et Dauvilliers (L.). — *J. Radiol. et Electrol.*, 1944-45, *26*, 82. — Cf également Bonet-Maury (P.). — *In « Les Ultra-Virus des maladies animales »*, de Levaditi (C.), p. 194.
(135) Fukunaga (S.) et Nagaoka (T.). — *Trans. Soc. Path. Japan*, 1928, *18*, 244-255.
(136) Gardner (W. U.), Smith (G. M.), Allen (E.) et Strong (L. C.). — *Arch. of Pathol*, 1936, *21*, 265.
(137) Gardner (W. U.). — *Pub. Am. Assoc. Adv. Sciences*, 1937, *67*.
(138) Garrigues (R.). — *Bull. Assoc. Franç. Etude Cancer*, 1944-1945, *32*, 131-144.
(139) Gautheret (R. J.). — *Manuel technique de cultures des tissus végétaux*, Masson, Paris 1942.
(140) Geschickter (C. F.). — *Science*, 1939, *139*, 35.
(141) Ghiron (V.). — *Bull. Acad. Med. Roma*, 1938, *64*, 134-135.

(142) Giaccobe (C.). — *Riforma Med.* 1931, *47*, 751.
(143) Gilman (A.) et Philips (F. S.). — *Science*, 1946, *103*, 409-415.
(144) Giovannoni (E.). — *Rass. Clin.* 1932, *31*, 167-180.
(144 bis) Girard (A.) et Saudulesco (G.). — *Helvatica*, 1936, *19*, 1905-1107.
(145) Glomaud (G.). — *Microdosage du Magnésium par l'o oxyquinoléine dans le sang et les milieux biologiques. Thèse Doctorat en Médecine, Paris*, 1939. Cf. antérieurement *Thèse Doctorat en Pharmacie, Paris*, 1933, et *Journal de Pharmacie et de Chimie*, 1934, *19*, 14-29..
(146) Goldzieher (M.). — *Verhandl. d. dtsch. Ges. f. Chir.*, 1912, *15*, 283.
(147) Goerner (A.) et Shafiroff (B. G. P.). — *J. Cancer Research*, 1928, *12*, 294-300.
(148) Goodman (L. S.), Wintrobe (M. M.), Dameshek (W.), Goodman (M. J.), Gilman (M. A.) et Mme Leman (M. T.). — *J. Am. Med. Assoc.*, 1946, *132*, 126-132.
(149) Gummel (H.). — *Klin. Woch.*, 1941, *20*, 448-449.
(150) Gunsett. — Cité par Robinet (L.) (309).
(151) Gunther (L.) et Greenberg (D. M.). — *Arch. Int. Med.*, 1930, *46*, 67.
(152) Gutman (A. B.) et Gutman (E. B.). — *J. Clin. Investigation*, 1938, *17*, 473.
(153) Gutman (A. B.), Tyson (T. L.) et Gutman (E. B.). — *Arch. Int. Med.*, 1936, *57*, 379-413.
(154) Haagen (E.). — *Arch. f. Exp. Zellforsch.*, 1927, *4*, 433.
(155) Haddow (A.) et Russel (H.). — *Am. J. Cancer*, 1937, *29*, 363-366.
(156) Haga (I.). — *Ztschr. f. Krebsforsch.*, 1913, *12*, 525.
(157) Hammet (F. S.). — *Protoplasma*, 1931, *13*, 331.
(158) Harris (P. N.). — *Cancer Research*, 1947, *7*, 35-36.
(159) Harris (P. N.). — *Cancer Research*, 1947, *7*, 26-34.
(160) Harnes (A. R.). — *J. Exp. Med.*, 1929, *50*, 109-120.
(161) Hearne (E. M.). — *Nature* (London), 1936, *138*, 291.
(162) Hershberg (E. B.) et Fieser (L. F.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1941, *63*, 2561-2564.
(163) Henshaw (P. S.) et Meyer (H. L.). — *J. Nat. Cancer Inst.*, 1944, *4*, 523-525.
(164) Hewett (C. L.). — *J. Chem. Soc.* (London), 1940, 293-303.
(165) Hewett (C. L.) et Martin (R. H.). — *J. Chem. Soc.* (London), 1940, 1396-1398.
(166) Hieger (I.). — *Biochem. J.*, 1927, *21*, 407-411.
(167) Hieger (I.). — *Am. J. Cancer*, 1940, *39*, 496-503.
(168) Hieger (I.). — *Cancer Research*, 1946, *6*, 657-667.
(169) Hieger (I.). — *Science*, 1941, *93*, 242-263.
(170) Hieger (I.). — *Nature* (London), 1942, *149*, 300-301.
(170 bis) Hirsch (R.). — *Bull. Acad. Méd.*, 1930, *104*, 539-548.
(171) Hoshino (T.). — *J. Osaka Med. Soc.*, 1922, *21*, n° 11 (d'après Shear (355).
(172) Hueper (W. C.). — *Cancer Research*, 1942, *2*, 551.
(173) Hueper (W. C.), Wiley (F. H.) et Wolfe (H. D.). — *J. Ind. Hyg.*, 1938, *20*, 46.
(174) Hueper (W. C.) et Russel (H.). — *Arch. f. Exper. Zellforsch.*, 1933, *14*, 483.
(175) Huguenin (R.), Truhaut (R.) et Helleu (Cl.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1946, *140*, 58-59.
(176) Huguenin (R.), Truhaut (R.) et Helleu (Cl.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1946, *140*, 433-434.

(177) HUTCHINSON (J.). — *Trans. Pathol. Soc.* (London), 1888, *39*, 352.
(178) IBALL (J.). — *Am. J. Cancer*, 1939, *35*, 188.
(179) ITAMI (S.). — *J. Am. Med. Assoc.*, 1919, *72*, 934-935.
(180) JACKSON (H. J.) et TAYLOR (F. H.). — *Am. J. Cancer*, 1933, *19*, 379.
(181) JACOBSON (L. O.), SPURR (Ch. L.), BARRON (E. S. G.), SMITH (T.), LUSHBAUGH (C.) et DICK (G. F.). — *J. Am. Med. Assoc.*, 1946, *132*, 263-271. — *Cancer Research*, 1947, *7*, 51-52.
(182) JAFFE (W. R.). — *Rev. Policlin.*, Caracas, 1944, *13*, 445-452.
(183) JAFFE (W. R.). — *Cancer Research*, 1927, *7*, 107-112.
(184) JAHODA (R.). — *Monatsheft. f. Chem.*, 1887, *8*, 442.
(185) JAYLE (M.), CRÉPY (O.) et JUDAS (O.). — *Bull. Soc. Chim. Biol*, 1943, *25*, 301-308.
(186) JENNER (H. D.) et KAY (H. D.). — *J. Biol. Chem.*, 1931, *93*, 733-748.
(187) JOBLING (J. W.), SPROUL (N. E.) et STEVENS (S.). — *Am. J. Cancer*, 1937, *30*, 667-684 et 685-698.
(188) JONES (R. N.) et MAY (C. D.). — *Cancer Research*, 1944, *4*, 304-312.
(189) JOSEPH (L.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med.*, 1939, *41*, 334.
(190) KARNOFSKY (D. A.), BURCHENAL (J. H.), ORMSEE (R. A.), CORNMANN (I.) et RHOADS (C. P.), *Cancer Research*, 1947, *7*, 50-51.
(191) KARRER (P.) et DEMOLE (V.). — *Schw. Med. Wochschr.*, 1938, *33*, 954.
(192) KATASE (T.), KAWAMURA (M.) et MIZUTANI. — *Verhandl. Japan Pathol. Gesellsch.*, 1920, *10*, 107 (cités d'après HAENDEL (M.). — *Ztschr. f. Krebsforsch.*, 1924, *21*, 281-287).
(193) KAY (H. D.). — *J. Biol. Chem.*, 1930, *89*, 235-247.
(194) KENNAWAY (E. L.) et HIEGER (I.). — *Brit. Med. J.*, 1930, *1*, 1044.
(195) KENNAWAY (E. L.) et SAMPSON (B.). — *J. Path. a. Bact.*, 1928, *31*, 609-612.
(195 bis) KENNAWAY (E. L.), KENNAWAY (N. M.) et WARREN (S.). — *Cancer Research*, 1942, *2*, 157.
(196) KENSLER (C. J.), DEXTER (S. O.) et RHOADS (C. P.). — *Cancer Research*, 1942, *2*, 1-10.
KENSLER (C. J.), YOUNG (N. F.) et RHOADS (C.). — *J. Biol. Chem.*, 1942, *143*, 465-472.
(197) KENTARO (S.). — *Trans. Soc. Path. Japan*, 1932, *22*, 985-988.
(198) KIMURA (Y.). — *J. Bioch.*, 1928, *8*, 469-494.
(199) KINOSITA (R.). — *Yale J. Biol.*, 1940, *12*, 287.
(200) KINOSITA (R.). — *Trans. Soc. Path. Japan*, 1937, *27*, 665.
(201) KIRBY (A. H. M.), *Cancer Research*, 1945, *5*, 673-683.
(202) KIRBY (A. H. M.). — *Cancer Research*, 1943, *3*, 519-525.
(203) KISSER (J.). — *Berichte d. Deutsch. Bot. Ges.*, 1939, *57*, 506-515.
KISSER (J.) et LINDERBERG (L.). — *Jahrb. f. Wiss. Bot.*, 1940-1941, *89*, 89-155.
(204) KLEINENBERG (H. E.), NEUFACH (S. A.) et SCHABAD (L. M.). — *Am. J. Cancer*, 1940, *39*, 463-488. — *Cancer Research*, 1941, *1*, 853.
SCHABAD (L. M.). — *Cancer Research*, 1945, *5*, 405-419.
(205) KLENK (E.). — *Ztschr. J. Physiol. Chem.*, 1926, *153*, 74-82.
Id. et DIEBOLD (W.). — *Ibid.*, 1931, *198*, 25-32.
(206) KOBER (S.). — *Biochem. Ztschr.*, 1931, *239*, 209-212.
(207) KOEHLER (F.). — *Ztschr. f. Physiol. Chem.*, 1934, *233*, 98-104.
(208) KÖGL (F.) et HAAGEN-SMIT (A. J.). — *Proc. Kon. Acad. Wet.* (Amsterdam), 1931, *34*, 1411-1416.
Id. et ERXLEBEN (H.). — *Ztschr. f. Physiol. Chem.*, 1933, *214*, 241-262;

(209) KONOPLEFF (P.). — *Z. Sowrem. Chir.* (Leningrad), 1928, *3*, 831-842.
(210) KORTEWEG (R.). — Cité par BUTENANDT (A.) (59).
1934, *225*, 215-229 et 90-103.
(211) KOTZAREFF (J.), DE MORSIER et MORIN (A.). — *Bull. Acad. Méd.*, 1929, *102*, 11-12.
(212) KREHBIEL (O.). — *J. Cancer Research*, 1920, *5*, 199-203.
(213) KREYBERG (L.) et SCHRADER-NIELSEN (S.). — *Act. Path. Scand.*, 1935, *12*, 165; et *Norsk Mag. f. Laegevidensk.*, 1934, *95*, 1389.
(214) LACASSAGNE (A.). — a) *Les cancers produits par les rayonnements électromagnétiques. Actualités scientifiques et industrielles*, Paris. HERMANN et Cie, 1945. — b) *Les cancers produits par les rayonnements corpusculaires. Mécanisme présumable de la cancérisation par les rayons. Actualités scientifiques et industrielles*, Paris. HERMANN et Cie, 1945.
(215) LACASSAGNE (A.). — *Les cancers produits par des substances chimiques exogènes. Actualités scientifiques et industrielles*, Paris, HERMANN et Cie, 1946.
(216) LACASSAGNE (A.), BUU-HOÏ (N. P.), LECOCQ (J.) et RUDALI (G.), Bull. *C. R. Soc. Biol.*, 1945, *139*, 955-957. *Bull. Assoc. Franç. Etude Cancer*, 1946, *33*, 48-59.
(217) LACASSAGNE (A.), BUU-HOÏ (N. P.), LECOCQ (J.) et RUDALI (G.). — *Bull. Assoc. Franç. Etude Cancer*, 1947, *34*, 22-29.
(218) LACASSAGNE (A.), BUU-HOÏ (N. P.) et CAGNIANT (P.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1944, *138*, 16-18. — LACASSAGNE (A.), BUU-HOÏ (N. P.) DAUDEL (R.) et RUDALI (G.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1944, *138*, 282-284. — LACASSAGNE (A.), BUU-HOI (N. P.) et RUDALI (G.). — *Brit. Exp. Path.*, 1945, *26*, 5 et *C. R. Soc. Biol.*, 1945, 139, 485-486.
(219) LACASSAGNE (A.). — *R. C. Acad. Sciences* 1932, *195*, 630-632.
(220) LACASSAGNE (A.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1933, *114*, 427-429.
(221) LACASSAGNE (A.). — R. C. Soc. Biol., 1936, *121*, 607-609.
(222) LACASSAGNE (A.). — *Bull. Assoc, Franç. Etude Cancer*, 1938, *27*, 96-116.
(223) LACASSAGNE (A.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1938, *129*, 641-642.
(224) LACASSAGNE (A.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1939, *132*, 365-368.
(225) LAEMMER (M.). — *Bull. Soc. Thérap.*, 1936, *41*, 189-192.
(226) LARIONOW (L.), IVACHENTZOVA (W. G.), et TCHERTKOVA (M. A.). — *Bull. Biol. et Med. Exper. U. R. S. S.*, 1938, *6*, 113-117.
(227) LARSEN (C. D.), et HESTON (W. E.). — *Abstr. Proc.* 36e *Ann. Meet. Am. Assoc. Cancer Research, Cancer Research*, 1945, *5*, 592.
(228) LASER (H.). — *Arch. f. exper. Zellforsch*, 1928, *6*, 142-146.
(229) LATHROP (A. E. C.) et LOEB (L.). — *Proc. Soc. f. Exp. Biol. a. Med.*, 1913, *11*, 34.
(230) LAW (L. W.). — *Cancer Research*, 1941, *1*, 397-401.
(231) LAW (L. W.). *Proc. Soc. f. Exp. Biol. a. Med.*, 1941, *47*, 37-39.
(232) LECLOUX (J.), VIVARIO (R.) et FIRKET (J.). — *R. C. Soc. Biol.*, 1927, *97*, 1823-1825.
(233) LEICHER (H.). — *Med. Wchschr*, 1925, *72*, 762.
(234) LEITCH (A.) et KENNAWAY (E. L.). — *Brit. Med.*, 1922, *2*, 1107.
(235) LEITER (J.) et SHEAR (M. J.), *J. Nat. Cancer Inst.*, 1943, *3*, 455.
(236) LEMELAND (P.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1923, *5*, 110-119.
(237) LENENBERGER (S. G.) — *Beitr. Klin. Chir.*, 1912, *80*, 208-308.
(238) Mlle LÉVY (J.) et GUTHMANN (G.). — *Bull. Acad. Med.*, 1932.

(239) LEWIN (A.). — *Z. Urol.*, 1913, *7*, 282 et « *Die Aetiologie der bösartigen Geschulste* », *Berlin, Springer*, 1928.
(240) LEWIS (M. R.). — *Am. J. Cancer*, 1935, *25*, 305-309.
(241) LINDENBERG (A.). — *Verhandl. d. Deutsch. Path. Gesellsch.*, 1937, *30*, 367-374.
(242) LIVRAGE : Cité par LAVEDAN (J.) et COURTIAL (J.). — *Paris Médical*, 1942, *32*, 125-134, dans une revue à laquelle nous avons fait, à propos de la question de l'activité cancérigène des sels de zinc, de très larges emprunts.
(243) LOCKE (S. D.), RIKER (A. J.), et DUGGAR (D. M.). — *J. Agr. Researd*, 1938, *57*, 21-40.
(244) LOEB (L.), BURNS (E. L.), SUNTZEFF (V.), et MOSKOP (M.). — *Proc. Soc. f. Exp. Biol. a. Med*, 1936, *35*, 320.
(245) LORENZ (E.) et STEWART (H. L.). — *J. Nat. Cancer Ins.*, 1940, *1*, 273-276, et STEWART (H. L.). — *Arch. Path.* 1940, *29*, 153-162.
(246) LOUROS (N.) et GAESSLER (D.). — *Ztschr. f. Krebsforsch*, 1929, *28*,
(247) LUBENSTEIN (H.). — *Ztschr. f. Exp. Med.*, 1937, *100*, 456-457.
(248) LUDFORD (R. J.). — *Am. J. Cancer*, 1937, *31*, 414. 191-218.
(249) MAC DONALD (E.). — *Med. J. Rec.*, 1927, *125*, 795.
(250) MAGNUS (H. A.). — *J. Path. a. Bact.*, 1939, *49*, 21.
(251) MAISIN (J.), DESMEDT (R.), et JACQUIN (L.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1927, *96*, 1056-1058.
(252) MAISIN (J.). — *Ann. Surg.*, 1931, *93*, 180-189.
(253) MARCHI (C.). — *Scritti Biol.*, 1930, *5*, 295-302, et *Riforma Med.* 1930, *46*, 55-56.
(254) MARGOLIN (L.). — *Ztschr. f. Krebsforsch*, 1924, *21*, 484-493.
(255) MARULLAZ (M.). — *Bull. Acad. Med.*, 1929, *102*, 48-50.
(256) MARUYA (H.), et TAMAKA (S.). — *Osaka Igatu Z.*, 1936, *35*, 2.303, cités d'après KINOSITA (200).
(257) MAUER (G.). — *Arch. f. Exp. Zellforsch*, 1938, *21*, 191.
(258) MENKE (J.). — *Science*, 1940, *11*, 290-291.
(259) MENKE (J.). — *Cancer Research.*, 1942, *2*, 786-793.
(260) MICHALOVSKY (I.). — *Virchows Arch.*, 1929, *274*, 319.
(261) MILLER (J. A.), et BAUMANN (C. A.). — *Cancer Research.*, 1945, *5*, 227-234 et 1946, *6*, 289-295.
(262) MORAVECK (V,). — *Acta Radiol. Cancer Boh*, 1938, *1*, 67, cité d'après VON EULER (H.) et SKARZYNSKI (B.). — *Biochemie der Tumoren*.
(263) MORAVÉCK (V.). — *Ztschr. f. Krebsforch*, 1932, *36*, 386-398. *Stuttgart*, 1942.
(264) MOREAU (R.). — « *Quelques nouveautés thérapeutiques* », Conférence faite à l'amphitréâtre de l'hôpital Necker pour le perfectionnement des Internes en Pharmacie des Hôpitaux et Hospices de Paris. *Libre Pharmacie*, 1946, *3*, 8-13.
(265) MORIGAMI (S.). — *Gann.*, 1939, *33*, 281-285.
(266) MORTON (A. A.), BRANCH (C. F.), et CLAPP (D. B.). — *Am. J. Cancer*, 1936, *26*, 754-760.
(267) MUELLER (G. C.), MILLER (J. A.), et RUSCH (H. P.). — *Cancer Research*, 1945, *5*, 401-404.
(268) MUELLER (G. C.), MILLER (J. A.), et RUSCH (H. P.). — Cancer Research., 1945, *5*, 401.
(269) MURRAY (W. S.), et LITTLE (C. C.). — *Am. J. Cancer*, 1936, *27*, 516.

(270) NAGAO (N.). — *Gann.* 1937, *31*, 79.
(271) NASSAUER (M.). — a) *Angewandte Chemie*, 1919, *32*, 333-335 et 610-611. — b) *Frankfurt. Z. Pathol.* 1920, *22*, 353-395.
(272) NETTLESHIP (A.) et HENSHAW (P. S.). — *J. Nat. Cancer Inst.*, 1934, *4*, 309-319.
(273) NEUFACH (S. A.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1937, *124*, 616-617.
(274) NEWMAN (M. S.), et JOSHEL (L. M.). — *J. Am. Soc. Chem. Soc.*, 1940, *62*, 272.
(275) NICOD (J. L.) et REGAMEY (J.). — *Bull. Assoc. Franç. Etude Cancer*, 1938, *27*, 706.
(276) NIKOLSKIJ (I.). — *Vopr. Onkol.*, 1929, *2*, 215-217.
(277) NISHIYAMA (Y.). — *Gann.*, 1935, *29*, 285.
(278) NISHIYAMA (Y.). — Gann., 1937, *31*, 223-225 et 1938, *32*, 85-99.
(279) NONAKA (T.). — Gann., 1938, *32*, 234-235.
(280) PARIS (J. A.). — *Pharmacologia (London)*, 1820, cité d'après FRANSEEN et TAYLOR (131).
(281) PAVAO (S.). — *Lijeen, Vjesn*, 1938, *60*, 154-156 (Zagreb).
(282) PEACOCK (P. E.) et KIRBY (A. H. M.). — *Cancer Research*, 1944, *4*, 88.
(283) PEACOCK (P. H. R.) et CHALMERS (J. G.). — *Biochem. J.*, 1936, *30*, 1242.
(284) PENN (H. S.). — *J. Chem. Phys.*, 1942, *10*, 145-146 et *Nature* (London) 1942, *149*, 193-194.
(285) PERLMANN (S.) et STAEHLER (W.). — *Ztschr. Urol. Chir.*, 1932, *36*, 139.
(286) PETERS (R. A.). — « *Rôle de l'Aneurine dans les processus bio-chimiques* ». Conférence faite le 7 mai 1946 devant la Soc. de Chimie Biologique où se trouvent rassemblées toutes les références sur les travaux de l'Ecole anglaise. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1946, *28*, 700-715.
(287) PETROFF (N.). et KROTKINA (N.). — *Bull. Assoc. Franc. Etude Cancer*, 1928, *17*, 566 et 1929, *18*, 688.
(288) PITTS (H. T.) et JOHNSON (H. R.). — *New. Engl. J. Med.* 1930, *202*, 415-423.
(289) POLETTINI (B.). — *Tumori* 1938, *12*, 101-113 et *Arch. Ital. Med. Sper.*, 1938, *5*, 17-24.
(290) POLLARD (A.) et AMIES (C. R.). — *Brit. J. Exp. Path.*, 1937, *18*, 198-204.
(291) POTTER (V. R.). — *Cancer Research.*, 1942, *2*, 688-693.
(292) POZZI. — *Bull. Soc. Anat. Paris*, 1874, *19*, 587-588.
(293) PROHASKA (J. V.), BRUNSCHWIG (A.), et WILSON (H.). — *Arch. Surg.* 1939, *38*, 328.
(294) Mme PULLMAN (A.). — *Bull. Ass. Franç. Etude Cancer*, 1946, *33*, 120-130, *Ann. de Chimie*, 1947, *2*, 1-70.
(295) Mme PULLMAN (A.). — *C. R. Acad. des Sciences*, 1945, *221*, 140-142 et 1946, *222*, 663-664.
(296) PULLMAN (B.). — *C. R. Acad. Sciences*, 1946, *222*, 1501-1502.
(297) Mme RANDOUIN (L.) et FABRE (R.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1927, *9*, 1027-1069.
(298) REDING (R.) et RLOSSE (A.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1923, *88*, 644-646. — REDING (R.) et DUSTIN (A. P.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1923, *88*, 301-302. — REDNG (R.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1923, *88*, 817-818. — SLOSSE (A.) et REDING (R.). — *Bull. Acad. Roy. Med. Belge*, 1924, *4*, 268-290 et 1925, *5*, 166-173.
(299) REDING (R.). — *Arch. Intern. Med. Exp.*, 1927, *3*, 712-780.
(300) REDING (R.) et SLOSSE (A.). — *Bull. Assoc. Franç. Etude Cancer*, 1929, *18*, 122-151.

(301) Reding (R.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1940, *133*, 450-453.
(302) Reding (R.), Joukowsky (N. I.), et Timmerman (A. N.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1939, *130*, 273-276.
(303) Rehn (L.). — *Arch. Clin. Chir.*, 1895, *50*, 588, et *Verhandl. Deutsch., Gesell. Chir., Berlin*, 1906, *35*, 313.
(304) Reinhard (M. C.), et Candee (C. F.). — *Am. J. Cancer*, 1936, *26*, 552.
(305) Remond (A.), Sendrail (M.) et Lassalle (C. P.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1925, *93*, 1061-1063.
(306) Remond (A.) et Cantegril (E.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1930, *104*, 293-294.
(307) Rhoads (E. P.). — *J. Am. Med. Assoc.*, 1946, *131*, 656-658, *Cancer Research.*, 1947, *7*, 53-55.
(308) Robertson (B.), et Bornett (T. C.). — *J. Exp. Med.*, 1913, *17*, 344.
(309) Robinet (L.). — *Bull. Assoc. Franç. Etude Cancer*, 1930, *19*, 243-262, 1931, *20*, 434, 1932, *21*, 464 et *Bull. Acad. Med.*, 1930, 103, 440-447 et 1931, *106*, 48-50.
(310) Robson (J. M.), et Bonser (G. M.). — *Nature*, (London), 1938, *142*, 836.
(311) Roche (J.), Van Thoai (M.), Marcelet (J.), Desruisseaux (G.), et Mlle Durant. — *Bull. Acad. Med.* 1946, *130*, 294-298.
(312) Roffo (A. H.). — *Bull. Assoc. Franç. Etude Cancer*, 1939, *32*, 556-88.
(313) Roffo (A. H.). — *Bol. Inst. Med. Exp. Cancer* (Buenos-Aires), 1941. *18*, 929-948.
(314) Roffo (A. H.). — *Ztschr. f. Krebsforsch*, 1938, *47*, 473, 1939, *49*, 341, et *Bol. Inst. Méd. Exp. Cancer* (Buenos-Aires), 1937, *14*, 589-655.
(315) Roffo (A. H.). — *C. R. Acad. Sciences* 1925, *180*, 228-229.
(316) Roffo (A. H.). — *Bull. Assoc. Franç. Etude Cancer*, 1924, *12*, 71 (nombreuses autres publications).
(317) Rondoni (R.), et Corbellini (A.). — *Tumori*, 1936, *22*, 106.
(318) Rondoni (R.) et Carminati (A.). — *Ztschr. f. Krebsforsch*, 1930, *31*, 577.
(319) Rosenthal (E.) et Erdelyi (J.). — *Biochem. Ztschr.*, 1933, *267* 119-123.
(320) Roussy (G.), Guerin (P.) et Guerin (M.). — *Bull. Assoc. Franç. Etude Cancer*, 142, *30*, 66-73.
(321) Roussy (G.) et Guerin (M.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1947, *141*, 93-94.
(322) Rowntree (L. G.), Lansbury (J.) et Steinberg (A.). — *Proc. Soc. f. Exp. Biol. a. Med.* 1937, *36*, 424-426.
(323) Rowntree (L. G.), Steinberg (A.), Dorrance (G. M.) et Ciccone (E. F.). — *Trans. Assoc. Am. Phys.*, 1937, *52*, 344 et *Am. J. Cancer*, 1937, *31*, 359-723.
(324) Rowntree (L. G.) et Ziegler (W. M.). — *Proc. Soc. f. Exp. Biol. a.*
(325) Rusch (H. P.), Mueller (G. C.) et Kline (B. E.). — *Cancer Re-Med*, 1943, *54*, 121-123
search, 1945, *5*, 565.
(326) Rusch (H. P.), Bowman (C. A.), Kline (B. E.). — *Proc. Soc. f. Exp. Biol., Med.*, 1931, *42*, 508-512.
(327) Sachs (D.), Ephrussi (B.) et Rapkine (L.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1933, *113*, 708-710 et 829-830.
(328) Sachs (D.). — *Arch. f. exp. Zellforsch*, 1934, *15*, 179.
(329) Sandin (R. B.). et Fieser (L. F.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1940, *62*, 3.098-3.105.

(330) Sannié (C.) et Truhaut (R.). — a) « *Les agents chimiques cancérigènes* », *Bull. Ass. Franç. Etude Cancer*, 1934, *23*, 6-37 ; b) *La Pharmacie Franç., février, mars et avril* 1935. c) Sannié (C.). — « *Le Cancer chimique* », exposés annuels de Biochimie médicale, première série, Masson, *Paris*, 1939, 163-186, et « *Pouvoir cancérigène et constitution chimique* », *Pharmacie*, 1943, *1*, 134-140 et 179-183.

(331) Sannié (C.) et Poremski (V.). — *Bull. Soc. Chim.* 1936 (5), *3*, 1.139-1.155.

(332) Sannié (C.). — *Bull. Soc. Chim.*, 1937, (5), *4*, 580-582.

(333) Sannié (C.), Truhaut (R.), Guérin (P.) et Guérin M.). — *C. R. Acad. Sciences*, 1940, *211*, 365-368 et *Bull. Assoc. Franç. Etude Cancer*, 1940, *29*, 106-121.

(334) Sasaki (T.) et Yoshida (T.). — *Virchow's Arch.*, 1935, *295*, 175.

(335) Sartory (A.), Sartory (R.), Meyer (J.) et Keller (E.). — *C. R. Acad. Sciences*, 1932, *195*, 400-403.

(336) Schabad (L. M.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1937, *124*, 213-216 et *126*, 1.180-1.184. *Bull. Biol. Med. Exper. U. R. S. S.*, 1938, *5*, 3. *Acta Med. U. R. S. S.* 1939, *2*, 34. *Arch. Biol. Nauk*, 1938, *50*, 51. *Acta Un. Int. c. Cancer*, 1938, *3*, 189-198. — Neufach (S. A.) et Schabad (L. M.). — *Bull. Biol. Med. Exper. U. R. S. S.*, 1938, *6*, 259. — Kleinenberg (H. E)., Neufach (S A.) et Schabad (L. M.). — *Bull. Biol. Med. Exper. U. R. S. S.*, 1939, *25*, 8. *Arch. Biol. Nauk.*, 1940, *58*, 3. *Am. J. Cancer*, 1940, *39*, 463-488. — Schabad (L. M.) et Kleinenberg (H. E.). — *Bull. Biol. Med. Exper. U. R. S S.*, 1939, *8*, 288-300.

(337) Schar (W.). — *Dtsch. Ztsch. Chir.*, 1930, 226, *81*, *et Le Cancer*, 1930, *7*, 205.

(338) Schepetinsky (A.) et Kafitin (M.).— *Arch. f. Gynäk*, 1929, *136*, 379-387.

(339) Schiller (W.). — *Am. J. Cancer*, 1937, *31*, 486-490.

(339 bis) Serbescu (M.). — *Bull. Acad. Méd.*, 1934, *111*, 435-437.

(340) Shimkin (M. B.) et Andervont (H. B.). — *J. Nat. Cancer Inst.* 1940, *1*, 537.

(341) Schinz (H. R.) et Uehlinger (E.). — *Ztschr. f. Krebsforsch*, 1942, *52*, 425.

(342) Schmidt (M. P.). — *Virchow's Arch.*, 1924, *253*, 432.

(343) Schmidt (O.). — *Naturwissenschaften*, 1941, *29*, 146.

(344) Schoonover (J. W.) et Ely (J. O.). — *Biochem. J.*, 1935, *29*, 1809-1816.

(345) Schrumpff-Pierron (P.). — *Bull. Assoc. Franç. Etude Cancer*, 1931, *20*, 307-322. — *Bull. Acad. Méd.*, 1931, *105*, 818-823. — *Bull. Inst. Egypte*, 1932, 14, 177. — *Ztschr. f. Krebsforsch.*, 1932, *36*, 145.

(346) Schürch (O.) et Winterstein (A.). — *Ztschr. f. Physiol. Chem.*, 1935, *236*, 79-91.

(347) Sempronj (A.) et Morelli (E.). — *Am. J. Cancer*, 1939, *35*, 534.

(348) Severi (R.). — *Riv. Pat. Sper.*, 1932, *8*, 327. — *Pathologica*, 1934, *26*, 416; 1935, *27*, 524.

(349) Shear (M. J.) et Leiter (J.). — *J. Nat. Cancer Inst.*, 1941, *2*, 241-258.

(350) Shear (M. J.). — *Am. J. Cancer*, 1938, *33*, 499-537.

(351) Shear (M. J.). — *Am. J. Cancer*, 1937, *29*, 269.

(352) Shear (M. J.). — *Am. J. Cancer*, 1936, *28*, 334.

(353) Shear (M. J.) et Lorenz (E.). — *Am. J. Cancer*, 1939, *36*, 201-210.

(354) Shear (M. J.) et Ilfeld (F.). — *Am. J. of Path.*, 1940, *16*, 287-294.

(355) Shear (M. J.). — *Am. J. Cancer*, 1933, *18*, 972-984.

(356) Simoes Raposo (L.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1928, *98*, 86-88.

(357) Simpson (W. L.) et Cramer (W.). — *Cancer Research*, 1945, *5*, 5-10.
Simpson (W. L.), Carruthers (C.) et Cramer (W.). — *Cancer Research*, 1945, *5*, 1-4.

(358) Skau (E.) et Bergmann (W.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1938, *60*, 986-987.

(359) Snyder (F. H.) et Tweedy (W. R.). — *J. Biol. Chem.*, 1942, *146*, 639-647.

(360) Sobotka (H.) et Bloch (E.). — *Am. J. Cancer*, 1939, *35*, 50-54.

(361) Stavely (H. E.) et Bergmann (W.). — *J. Organ. Chem.*, 1937, *1*, 575.

(362) Steele (P. H.), Koch (F. C.) et Steiner (P. E.). — *Cancer Research*, 1941, *1*, 614-617.

(363) Steiner (P. E.), Steele (R.) et Koch (F. C.). — *Cancer Research*, 1943, *3*, 100-107.

(364) Steiner (P. E.). — *a) Science*, 1940, *92*, 431-432; *b) Cancer Research*, 1942, *2*, 425-435; et 1943, *3*, 385-395. — *Int. Abstr. Surg.*, 1943, *76*, 105-112.

(365) Stern (E. A.). — *Culture des tissus et Cancer*, thèse Doctorat en Médecine, Paris, 1936.

(365 bis) Stevenson (E. S.), Dobriner (K.) et Rhoads (C. P.). — *Cancer Research*, 1942, *2*, 160.

(366) Strong (L. C.), Smith (G. M.) et Gardner (W. U.). — *Yale J. Biol. a. Med.*, 1938, *10*, 335.

(367) Stowell (R. E.) et Cramer (W.). — *Cancer Research*, 1942, *2*, 193.

(368) Sugiura (K.), Halter (C. R.), Kensler (C. J.) et Rhoads (C. P.). — *Cancer Research*, 1945, *5*, 235-238.

(369) Sugiura (K.) et Benedict (S. R.). — *J. Cancer Research*, 1922, *7*, 329-369. — *Am. J. Cancer*, 1935, *23*, 301.

(370) Sugiura (K.). — *Proc. Soc. f. Exp. Biol. a. Med.*, 1941, *47*, 17-19.

(371) Suntzeff (V.) et Carruthers (C.). — *Cancer Research*, 1943, *3*, 431-433.
Carruthers (C.) et Suntzeff (V.). — *Science*, 1944, *99*, 245-247.

(372) Suntzeff (V.), Babcock (R. S.) et Loeb (L.). — *Am. J. Cancer*, 1940, *39*, 56-60.

(373) Svehla (K.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1926, *94*, 980-981.

(374) Tabanelli (M.). — *Rev. d. Path. Sper.*, 1933, *10*, 234-252.

(375) Takizawa (N.). — *Proc. Imp. Acad. Tokyo*, 1940, *16*, 309-312.

(376) Takizawa (N.). — *Gann.*, 1938, *32*, 236-237; et 1939, *33*, 193-195 .

(377) Thannhauser (S. J.) et Setz (P.). — *J. Biol. Chem.*, 1936, *116*, 527-531.

(378) Thannhauser (S. J.) et Fraenkel (E.). — *Ztschr. f. Physiol. Chem.*, 1931, *203*, 183-188.

(379) Theis (R. C.) et Benedict (S. R.). — *J. Cancer Research*, 1924, *8*, 499-503.

(380) Thomas (L.) et Kreitmann (L.). — *Bull. Acad. Méd.*, 1931, *106*, 124-126.

(381) Trappe (W.). — *Die Lipoidlöslichen Stoffe.* — in « Das Geschwulstproblem in Chemie und Physiologie », de Hinsberg (K.), Dresden et Leipzig (1942).

(382) Truhaut (R.). — *Les substances chimiques, agents de cancérisation expérimentale;* a) *Chimie et Industrie*, 1938, *39*, 419-430; b) *Revue Médicale de France*, 1937, *5*, 119-194; c) *Revue Médicale Française*, 1939, *20*, 233-246.

(383) Truhaut (R.). — *Récentes acquisitions dans le domaine des ultra-virus : Les Virus-protéides et les Phages-protéides. Journal de Pharmacie et de Chimie*, 1939, *30*, 213-232 et 272-293.

(384) Truhaut (R.) et Theodorescо (M.). — *C. R. Acad. Sciences*, 1946, *223*, 618-620.

(385) Cf. 365 *bis*.

(386) Tsutsui (H.). — *Gann.*, 1918, *12*, 17.

(387) Twombly (G. H.). — *Proc. Soc. f. Exp. Biol. a. Med.*, 1939, *40*, 430.

(388) Twort (C. C.) et Fulton (J. D.). — *J. Path. a. Bact.*, 1930, *33*, 119-143.

(389) Ueilinger (E.) et Schinz (H. R.). — *Ztschr. f. Krebsforsch.*, 1942, *52*, 425-437. — *Schweiz Med. Wschr.*, 1942, *72*, 1070-74.

(390) Valade (P.). — *Bull. Assoc. Franç. Etude Cancer*, 1938, *27*, 723-729.

(391) Veldstra (H.). — *Nature* (London), 1939, *144*, 246-247.

(392) Velluz (L.). — *Thèse Fac. Méd. Lyon*, 1934.

(393) Verne (J.) et Verne-Soubiran (A.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1938, *127*, 1090-1092.

(394) Vincenti (M.). — *Arch. Ital. Chir.*, 1942, *62*, 381-394.

(395) Von Moellendorff (W.). — *Klin. Woch.*, 1939, *11*, 1098-1099.

(396) Wachtel (H. K.). — *Nature* (London), 1946, *158*, 98.

(397) Wachtel (H. K). — *Science*, 1946, *103*, 556-557.

(398) Waterman (N.). — *Acta. Cancrologica*, 1936, *2*, 375; et *Leeuwenh. Vereenig.*, 1937, *4*, 83; *Acta Unio. Intern. contra cancro*, 1939, *4*, 764; et *Acta Brev. Néerland.*, 1937, *7*, 18-20.

(399) Waterman (N.). — *Biochem. Ztsch.*, 1922, *133*, 535-597.

(400) Waterman (N.). — *Bull. Assoc. Franç. Etude Cancer*, 1940, *29*, 70-76.

(401) Waterman (N.). — *Acta. brev. Néerland.*, 1939, *9*, 143.

(402) Waters (L. A.) et Chester Stock. — *Science*, 1945, *102*, 601.

(403) Weigert (F.). — *Trans. Faraday Soc.*, 1943, *39*, 418-419.

(404) Weigert (F.) et Mottram (M. B.). — *Cancer Research*, 1946, *6*, 109-120.

(405) Weil Malherbe (H.) et Dickens (F.). — *Cancer Research*, 1942, *2*, 560-566; et 1944, *4*, 425-429.

(406) Wilhelm (R.) et Stern (K.). — *Biochem. Ztschr.*, 1933, *260*, 180-186.

(407) White (A. W. M.). — *J. Cancer Research*, 1927, *11*, 111.

(408) Whitman (W. G.). — *Am. J. Cancer*, 1933, *17*, 932-945.

(409) Widmark (E. M.). — *Nature* (London), 1939, *143*, 984.

(410) Wieland (H.) et Dane (E.). — *Ztschr. f. Physiol. Chem.*, 1933, *219*, 240-244.

(411) Wiley (F. H.). — *J. Biol. Chem.*, 1938, *124*, 627-630.

(412) Wilson (R. H.), de Eds (F.) et Cox (A. J.). — *Cancer Research*, 1941, *1*, 595.

(413) Windaus (A.), Bursian (K.) et Riemann (U.). — *Ztschr. f. Physiol. Chem.*, 1941, *271*, 177-182.

(414) Windaus (A.). — a) *Berichte*, 1909, *42*, 244; b) *Ztschr. f. Physiol. Chem.*, 1910, *65*, 110-117.

(415) Winterstein (A.), Vetter (H.) et Schön (E.). — *Berichte*, 1935, *68*, 1079-1085.

(416) Winterstein (A.) et Stein (G.). — *Ztschr. f. Physiol. Chem.*, 1933, *220*, 217-263.
Winterstein (A.) et Schön (K.). — *Ibidem*, 1934, *230*, 139-145.

(417) Wood (J. E.) et Fieser (L. F.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1941, *63*, 2323.

(418) Wodard (G. E.) et Fry (E. G.). — *J. Biol. Chem.*, 1932, *97*, 465-482.
(419) Yamagiwa (K.) et Itchikawa (K.). — *Tokyo Igakhai Zassi*, 1915, *15*, 295. — *J. Cancer Research*, 1918, *3*, 1. — *Experiment. Mitteil. Med. Fak. Univ. Tokyo*, 1916, *15*, 295; 1917, *17*, 19; 1918, *19*, 483. — *Virchows. Arch.* 1921, 233-235.
(420) Yamagiwa (K.) et Ohno (S.). — *Gann.*, 1918, *12*.
(421) Yoshida (T.). — *Proc. Imp. Acad. Tokyo*, 1932, *8*, 464. — *Gann.*, 1934, *28*, 454; 1935, *29*, 213-295 et 304. — *Trans. Soc. Path. Japan*, 1932, *22*, 193, 934; 1933, *23*, 636; et 1934, *24*, 523.

APPENDICE

Nous croyons utile de définir quelques expressions du domaine de la pathologie, utilisées au cours de l'exposé de ce travail.

ADÉNOME. — Tumeur bénigne des muqueuses cylindriques ou des parenchymes glandulaires.

CANCER. — Tumeur maligne de n'importe quelle espèce.

CHOLANGIOME. — Adénome (plutôt kystique) des voies biliaires (ROUSSY-GUÉRIN).

CHONDROME. — Tumeur bénigne du tissu cartilagineux.

CHONDROSARCOME. — Tumeur maligne du tissu cartilagineux.

EPITHÉLIOMA. — Tumeur maligne formée de cellules épithéliales.

EPITHÉLIOMA MALPIGHIEN. — Epithélioma de type malpighien : peut être spinocellulaire, basocellulaire ou intermédiaire.

EPITHÉLIOMA GLANDULAIRE. — Epithélioma de type glandulaire.

FIBROME. — Tumeur bénigne du tissu conjonctif proprement dit.

FIBROSARCOME ou sarcome fibroblastique ou sarcome fuso-cellulaire : tumeur maligne du tissu conjonctif proprement dit (pour certains auteurs, la première de ces expressions indiquerait une malignité moins accentuée que les deux autres).

HÉPATOME. — Epithélioma d'origine hépatique à structure adénomatoïde.

LIPOME. — Tumeur bénigne du tissu adipeux.

LIPOSARCOME. — Tumeur maligne du tissu adipeux.

MYOME. — Tumeur bénigne du tissu myoïde. Peut être leïomyome ou rhabdomyome.

MYOSARCOME. — Tumeur maligne du tissu myoïde. Peut être : léïomyosarcome ou rhabdomyosarcome.

OSTÉOME. — Tumeur bénigne du tissu osseux.

OSTÉOSARCOME. — Tumeur maligne du tissu osseux.

PAPILLOME. — Tumeur bénigne des revêtements malpighiens (peau et muqueuses).

RÉTICULO-ENDOTHÉLIOSE. — Processus hyperplasique plus ou moins généralisé des éléments du système réticulo-endothélial.

RÉTICULO-GRANULOMATOSE. — Lésion hyperplasique inflammatoire plus ou moins généralisée du système réticulo-endothélial.

RÉTICULOSARCOME. — Tumeur maligne ayant pour origine les cellules vésiculaires.

SARCOME. — Tumeur maligne des tissus conjonctifs (largement définis).

TÉRATOME. — « Tumeurs où sont représentés, sans distinction de région, tous les tissus greffables de l'adulte. » (MASSON.)

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION 11

PREMIÈRE PARTIE. — *Les substances chimiques, agents de cancérisation expérimentale* 15

I. Les dérivés cancérigènes minéraux 16

II. Les dérivés cancérigènes organiques non azotés 17

III. Les dérivés cancérigènes organiques azotés 32

IV. Tableau d'activité des dérivés cancérigènes 45

V. Rapports de constitution entre les dérivés cancérigènes de synthèse et des molécules physiologiques 46

VI. Les théories chimiques du mécanisme d'action des dérivés cancérigènes 48

DEUXIÈME PARTIE. — *Recherches sur la cancérisation par le 3.4. benzopyrène* 55

CHAPITRE PREMIER. — Synthèse et purification du 3.4. benzopyrène 55

CHAPITRE II. — Recherches sur l'action cancérigène du 3.4. benzopyrène 60

I. Essais de cancérisation sur diverses espèces animales 60

II. Influence du solvant 66

III. Influence des doses utilisées 69

Conclusions des expériences de cancérisation sur l'animal.. 70

IV. Recherches sur l'action du 3.4. benzopyrène sur les tissus végétaux cultivés *in vitro* 71

CHAPITRE III. — Contribution à l'étude du mécanisme de l'action cancérigène du 3.4. benzopyrène : la théorie de WOOD et FIESER 73

I. Le glutathion dans le sang des cancéreux 73

II. Action du glutathion et de ses acides aminés constitutifs sur les cellules en culture 76

III. Recherche d'une libération éventuelle de substances à groupe — SH par action de carbures cancérigènes *in vitro* sur les protéides du sang 78

TROISIÈME PARTIE. — *Recherches sur l'action cancérigène éventuelle de substances alimentaires* 81

CHAPITRE PREMIER. — Magnésium et cancer 82

I. Recherches antérieures 82

II. Recherches personnelles 84

a) Magnésium sanguin dans les états cancéreux 84

b) Magnésium et activité phosphatasique alcaline du sang dans les états cancéreux 85
c) Le Calcium sanguin dans les états cancéreux 86
Chapitre II. — Recherches sur l'action cancérigène éventuelle de l'huile de germe de Blé 88
I. Considérations générales 88
II. Préparation de l'huile de germe de Blé 89
III. Expérimentation sur le Rat 91
Chapitre III. — Recherches sur l'action cancérigène éventuelle d'une phytohormone synthétique : l'acide α naphtylacétique .. 93
I. Considérations générales 93
II. Expérimentation sur la Souris 94
Quatrième Partie. — *Le problème des substances cancérigènes endogènes* 95
Chapitre premier. — Considérations générales et travaux antérieurs 95
I. L'action cancérigène de composés normaux de l'organisme.. 95
II. Recherches sur la transformation, sous l'influence de divers facteurs, de molécules physiologiques en dérivés cancérigènes :
a) Bactéries 99
b) Chaleur 101
c) Radiations solaires et ultra-violettes 101
d) Rayons X. 102
III. Essais d'isolement de substances cancérigènes à partir de l'organisme cancéreux 103
Chapitre II. — Recherches sur l'action cancérigène éventuelle du cholestérol irradié par les rayons X 104
Chapitre III. — Nos recherches personnelles sur l'action cancérigène des insaponifiables de foies de sujets cancéreux 107
I. Préparation des insaponifiables 107
II. Essais sur l'animal :
a) Expérimentation sur la Souris 109
b) Expérimentation sur le Rat 113
III. Deuxième série d'expériences avec les insaponifiables 113
Chapitre IV. — Recherches de divers auteurs sur l'isolement de fractions cancérigènes à partir de l'organisme cancéreux 117
Chapitre V. — Recherches physiques, chimiques et biologiques sur les insaponifiables actifs : leur fractionnement 130
I. Action de l'insaponifiable de foies de sujets cancéreux sur les cultures de tissus *in vitro* 130
II. Etudes spectrographiques 133
III. Essais de séparation de fractions par utilisation combinée des solvants organiques et de l'adsorption chromatographique 134
IV. Essais de fractionnement par voie chimique :
a) Précipitation par le digitono-side 136

b) Utilisation du sel de Reinecke. — Isolement de la lignocérylsphingomyéline 137
c) Obtention de la fraction III 139
V. Expérimentation sur l'animal des fractions obtenues :
a) Expérimentation sur la Souris 140
b) Expérimentation sur le Rat 142
CHAPITRE VI. — Les substances cancérigènes endogènes dans le sang des cancéreux 142
I. Lipides totaux 143
II. Acides gras 144
III. Cholestérol 144
IV. Insaponifiable 146

CONCLUSIONS 149

BIBLIOGRAPHIE. 153

APPENDICE 169

IMPR. DU COMMERCE
R. PRIVE
3-5-7, RUE SAINT-PIERRE
SAINT-GERMAIN-EN-LAYE
TELEPHONE 93

Fig. 1

Epithélioma chez la Souris après badigeonnages avec le 3.4. benzopyrène.

Fig. 2

Sarcome du Rat obtenu par injections sous-cutanées de 3.4. benzopyrène.

FIG. 3

Lymphosarcome (Souris)
Expériences avec cholestérol irradié par les rayons X.

FIG. 4

Souris avec deux tumeurs :

A gauche : kyste hétatique.

A droite : sarcome.

Expériences avec l'insaponifiable de foies de sujets cancéreux.

Fig. 5

Tumeur cutanée épithéliomateuse avec vaste ulcération (Souris).

Expériences avec l'insaponifiable de foies de sujets cancéreux.

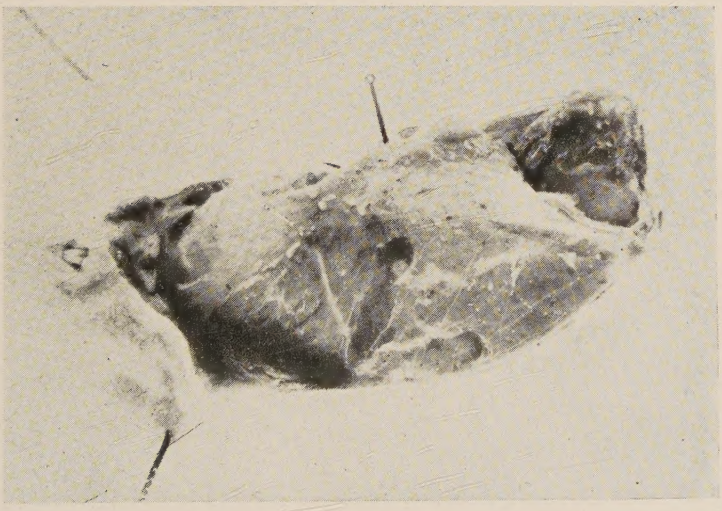


Fig. 6

Epithélioma glandulaire de la région inguinale gauche (Souris).

— Noter les granules d'extrait hépatique sur la paroi abdominale et au contact de la tumeur.

— Expériences avec l'insaponifiable de foies de sujets cancéreux.